

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal**

**Tarcisio Tomás Cabral de Sousa**

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA GLÂNDULA SALIVAR E NO INTESTINO**

**DE *Thaumastocoris peregrinus***

**Diamantina**

**2020**

**Tarcisio Tomás Cabral de Sousa**

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA GLÂNDULA SALIVAR E NO INTESTINO  
DE *Thaumastocoris peregrinus***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales  
do Jequitinhonha e Mucuri, Nível de Doutorado, como  
requisito para obtenção do título doutor em Ciência  
Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

**Diamantina  
2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S725p

Sousa, Tarcisio Tomás Cabral de

Perfil de expressão gênica na glândula salivar e no intestino de  
*Thaumastocoris peregrinus* / Tarcisio Tomás Cabral de Sousa, 2020.  
75 p.: il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Tese (Doutorado– Programa de Pós Graduação em Ciência  
Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,  
Diamantina, 2020.

1. Ácido ribonucleico. 2. Percevejo bronzeado. 3. *Eucalyptus*. I.  
Laia, Marcelo Luiz de. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales  
do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 634.967**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

**TARCISIO TOMÁS CABRAL DE SOUSA**

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA GLÂNDULA SALIVAR E NO INTESTINO DE *Thaumastocoris peregrinus***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível Doutorado, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Data de aprovação: 18/09/2020

**Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia**  
Orientador  
UFVJM

**Profª. Drª. Adriana de Fátima Meira Vital**  
Membro  
UFCG

**Profª. Drª. Raunira da Costa Araújo**  
Membro  
UFPB

**Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior**  
Membro  
UFVJM

**Drª. Any Carolyn Pinto Rodrigues**  
Membro  
Autônoma

DIAMANTINA - MG



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Luiz de Laia, Servidor**, em 23/09/2020, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Lourenço de Assis Júnior, Servidor**, em 23/09/2020, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Any Carolyn Pinto Rodrigues, Usuário Externo**, em 23/09/2020, às 21:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raunira da Costa Araújo, Usuário Externo**, em 23/09/2020, às 22:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana de Fátima Meira Vital, Usuário Externo**, em 23/09/2020, às 23:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0177154** e o código CRC **236C3CE6**.

Voinha (Ludugeria Neves) e Voinho (Santino Tomaz) (*in memorian*) que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência. Todos os ensinamentos de vocês me tornaram o homem que hoje sou. Antes tinha a presença física de vocês em minha vida, hoje tenho as lembranças de tudo o que passamos juntos e, claro, muita saudade, mas sei que tenho dois anjos no Céu olhando por mim.

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela proteção e ter me dado fé e coragem para continuar essa caminhada tão árdua e difícil.

A todos que me acolheram aqui em Diamantina –MG.

Ao professor Marcelo Laia pela orientação, oportunidades, confiança e parceria desenhados ao longo desses seis anos de mestrado e doutorado. Minha eterna admiração pelo exemplo de profissional e de determinação. E meus sinceros respeito e amizade pelo excepcional ser humano, Professor Marcelo gostaria que as pessoas conhecessem esse seu lado, que sempre mostra pulso firme, mas nunca deixa ninguém cair estando sempre ao lado de todos. Sou eternamente grato pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha e por todo apoio durante todos esses anos que estive no laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal.

A Prof. Janaina Gonçalves que sempre me ajudou, conversando e me acalmando diante de todas as adversidades que um doutorado faz em nossa vida.

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores. Aos membros do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, o meu reconhecimento e gratidão em especial Any Rodrigues, Ariadne Marques, Felipe Moreira, Jessica Naiara, Renata Avila.

Aos meus pais José Anchieta de Sousa e Maria José Cabral por entenderem e abraçarem meus sonhos, auxiliando nessa caminhada e que não mediram esforços para que eu chagasse até aqui.

Agradeço aos meus irmãos, Tomás Sousa e Tatianne e minhas sobrinhas Nicole e Maria Julia Rodrigues que me ajudaram e acompanharam todas as dificuldades, ajudando mesmo que com um sorriso. Meninas “titi” ama vocês!

A toda a minha família, em especial a meu Tio José Tomaz da Neves e sua esposa Penha Neves que tenho como se fossem meus segundos pais, os quais são minha grande fonte de inspiração, meu porto seguro.

Quero agradecer imensamente ao professor Sebastião Lourenço e a professora Miranda Titon, saibam que vocês dois são anjos que caíram em minha vida, sem vocês eu teria desistido desse doutorado.

Aos meus avós que me ajudaram muito, infelizmente não estão mais entre nós pra ver mais essa vitória alcançada, agradeço pelo apoio, confiança, aconchego, pelos conselhos e puxões de orelhas. Hoje sou quem sou graças a vocês, VOINHO (Santino Tomaz) VOINHA

(Ludugeria Raimundo) e VORITA (RITA CABRAL) agora vocês tem um neto com Dr. no nome, eu realizei o sonho de vocês!

A minha “linda” e eterna “NAMORIDA” Brenda Rodrigues, TE AMO LINDA. Meu muito obrigado por tudo, só nós dois sabemos o que passamos juntos. (Mas juntos venceremos).

Agradece a minha sogra Eliene Sonia Rodrigues, você é e sempre será muito especial para mim. Uma segunda mãe, uma amiga de verdade, alguém a quem sei que posso recorrer quando precisar, e em quem confio plenamente.

À banca examinadora, pela contribuição ao trabalho e disponibilidade.

As minhas orientadoras da Graduação Adriana Vital e Raunira da Costa Araújo pela oportunidade e confiança que depositaram em mim.

A o Prof. Danilo Bretas e Thyago Silva juntamente com todos os colaboradores do BIOex, laboratório vinculado ao CIPq (Centro Integrado de Pesquisa) UFVJM. Além do auxílio na pesquisa muitas vezes foram meus “psicólogos” que escutavam minhas angustias e sempre me orientavam.

A todos os bons amigos que aqui conheci, vocês foram essenciais nessa caminhada Andreлина Pinto e Familiares, Kamila Antunes, Kamila Carvalho, Isabel Moreirae Marinalva Martins.

A todos os Coxixolenses que me ajudaram financeiramente quando aqui fiquei dois anos do meu doutorado sem bolsa, esse Doutorado tem um pedacinho de cada um de vocês, Maria da Conceição Neves e Familiares, Maria de Lourdes Silva Sousa (Lurdinha) *in memoria*, Vera Lucia Neves, Tereza Neves e Familiares, Elizabethe Albino e Graça Souto, Fabiola Albino e Conceila Albino, Maria do Socorro Ferreira (Socorro de Zé Coquinho), Josélia Almeida e Geovana Pereira.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e a UFVJM pela oportunidade.

A CAPES, FAPEMIG, APERAM bioenergia, VERACEL E GERDAU pelo auxílio.

Por fim a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para concretização desta conquista.

A todos sou eternamente grato.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Percevejo bronzeado, visão geral.....	31
Figura 2 - Desenho do delineamento experimental. T1: Amostras extraídas usando (Protocolo 01: TRI Reagente® - SIGMA com modificações descritas. T2: Amostras extraídas usando (Protocolo 02: DSorbitol - SIGMA). T3: Amostras extraídas usando (Protocolo 03: RNeasy Mini-kit - Qiagen) R1, R2, R3, R4 e R5 são as repetições.....	32
Figura 3 - Volumes de tampão RLT para a ruptura e homogeneização da amostra .....	34
Figura 4 - Gel de eletroforese de RNA <i>T. peregrinus</i> com Protocolo 01: TRI Reagent ®. – SIGMA.....	37
Figura 5 - Gel de eletroforese de RNA <i>T. peregrinus</i> com Protocolo 02: D-Sorbitol – SIGMA.....	37
Figura 6 - Gel de eletroforese de RNA <i>T. peregrinus</i> com Protocolo 03: RNeasy Mini-kit ..QIAGEN.....	38
Figura 7 - Curva de Melting do Genes 18s.....	55
Figura 8 -Curva de Melting do Genes a-amy.....	55
Figura 9 - Curva de Melting do Genes Act.....	56
Figura 10 - Curva de Melting do Genes ALD-1.....	56
Figura 11 - Curva de Melting do Genes ChyT-1.....	57
Figura 12 - Curva de Melting do Genes G6PDH.....	57
Figura 13 - Curva de Melting do Genes GAPDH .....	58
Figura 14 - Curva de Melting do Genes GLU-1.....	58
Figura 15 - Curva de Melting do Genes GLY.....	59
Figura 16 - Curva de Melting do Genes GST.....	59
Figura 17 - Curva de Melting do Genes GT.....	60
Figura 18 - Curva de Melting do Genes L26.....	60
Figura 19 - Curva de Melting do Genes POLY-1.....	61
Figura 20 - Curva de Melting do Genes RproIR76b.....	61
Figura 21 - Curva de Melting do Genes TRY-1.....	62
Figura 22 - Curva de Melting do Genes TUB.....	62
Figura 23 - Curva de Melting do Genes U-GLU-1.....	63
Figura 24 - Estabilidade da expressão gênica dos genes de referência, quanto mais baixo o valor de M mais estabilidade tem os genes.....	65
Figura 25 - Comparação relativa da expressão gênica dos genes de interesse (a-amy,Ald-1, ChyT-1, Gllu-1, Gly, Gst, Gt, Poly, Try, U-Glu-1 ) em três grupos: insetos jejum de 2 horas,	

insetos alimentando com clone híbrido de Eucalyptus resistente, insetos alimentando com clone híbrido de Eucalyptus suscetível. No eixo Y está representada a média da expressão gênica relativa na escala log2. O erro padrão da média é indicado para um intervalo de confiança de 95%. Os dados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas tendo, cada uma, 2 réplicas técnicas.....67

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Primers Utilizados na Transcrição Reversa em Tempo Real – RT-qPCR.....	52
Tabela 2 - Componentes utilizados na transcrição reversa em tempo real – RT-qPCR.....	53

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	16
 <b>CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
1 <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (PERCEVEJO BRONZEADO).....	18
2 EXPRESSÃO GÊNICA E GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	19
3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT-QPCR.....	21
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
 <b>CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>Thaumastocoris peregrinus</i></b> .....	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4 CONCLUSÃO.....	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
 <b>CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO GÊNICA EM GLÂNDULA E INTESTINO DE <i>Thaumastocoris peregrinus</i></b> .....	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Extração de RNA Total.....	51
2.2 Genes de interesse e endógenos.....	51
2.3 Quantificação relativa dos genes de resposta imune.....	53
2.4 Análise da Transcrição Reversa em Tempo Real – RT-qPCR.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1 Identificação dos genes de referência mais estáveis.....	64
4 CONCLUSÃO.....	69

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O produto interno bruto nacional (PIB) de 1,1% no ano de 2018, teve uma grande participação dos produtos oriundos da floresta, de onde foi gerado uma receita total de 86,6 bilhões que correspondem a 1,3% de todo o PIB brasileiro. Em 2018 a área total de árvore plantada no país foi de 7,83 milhões de hectares, permanecendo praticamente inalterada quando comparada às plantações do ano de 2017. Desse total, 5,7 milhões de hectares são apenas de eucalipto, enquanto que a área de pinus soma 1,6 milhões de hectares, os 590 mil hectares restantes são a somatória de outras espécies como seringueira, acácia, teca e paricá (IBÁ, 2019).

Segundo o Instituto Brasileiro de Árvores (IBÁ), as florestas plantadas brasileiras são as mais produtivas do mundo. O Brasil em 2018 apresentou uma produtividade média de 36,0 m<sup>3</sup>/ha/ano para as espécies de *Eucalyptus* e 30,1 m<sup>3</sup>/ha/ano para *Pinus* (IBÁ, 2019). Porém apesar desses altos índices de produtividade florestal, fatores abióticos e bióticos vêm afetando essa produtividade, causando consideráveis perdas econômicas para os produtores e consequentemente para o país. Os fatores abióticos estão relacionados com as condições ambientais a exemplo do déficit hídrico, salinidade do solo, altas temperatura entre outros. Dentre os fatores bióticos, destacam-se o ataque de pragas e infecções por fitopatógenos.

Uma das pragas que vem causando danos à eucaliptocultura mundial é o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), o qual foi detectado no Brasil no ano de 2008 no Rio Grande do Sul e rapidamente se difundiu por todo território brasileiro. Por se tratar de uma praga exótica e recentemente descoberta, pouquíssimos são os trabalhos relacionados ao controle do inseto-praga, que passou a provocar danos diretos às plantas, com um aumento expressivo nos custos de produção e graves prejuízos econômicos (WILCKEN *et al.*, 2010).

O *T. peregrinus* é um inseto fitófago e se alimenta da seiva das folhas e galhos finos dos eucaliptos, tanto no estágio ninfal quanto na fase adulta, provocando um prateamento (clorose) das folhas. Essa sintomatologia confere às plantas um aspecto bronzeado que posteriormente ocasiona a queda das folhas, em casos extremos de elevada severidade pode levar a árvore a morte (JACOBS; NESER, 2005; WILCKEN *et al.*, 2010).

No ato da alimentação dos insetos sugadores de seiva, metabólitos secundários e proteínas de defesa, tais como inibidores de alcalóides, glucosinolatos, glucósidos, espécies reativas de oxigênio, quitinase, proteases e outras proteínas, são detectáveis no floema e tem sido demonstrado exercer efeitos negativos sobre estes insetos (WALZ *et al.*, 2004). Em função do hábito alimentar que apresentam, esses insetos secretam enzimas presentes em suas

glândulas salivares na parte externa do tecido vegetal para suprimirem as substâncias de respostas de defesa da planta e dessa forma conseguirem se alimentar.

O processo de alimentação prossegue da seguinte forma: após o alimento ser sugado pelo aparelho bucal, a substância alimentar vai direto para o intestino, onde o sistema digestivo vai desempenhar a função de desintoxicação das substâncias prejudiciais existentes no floema e que foram assimiladas no ato da alimentação (BROADWAY; DUFFEY, 1986; BOLTER; JONGSMA, 1997; PARDE; SHARMA; KACHOLE, 2010). Todo esse processo de desintoxicação torna o inseto resistente ao mecanismo de defesa da planta, visto que não foram anuladas pelas enzimas secretadas no ato da sucção da seiva. A resistência da praga aos compostos tóxicos presentes na seiva pode ser decorrente da super-expressão de enzimas de desintoxicação, há exemplos do monooxigenases do citocromo (P450), UDP-glucuronosiltransferase (UGT) e glutathione-S-transferase (GST), muito utilizada pelos insetos na metabolização de inseticidas químicos, protegendo do estresse oxidativo causado pelos xenobióticos (RANSON *et al.*, 2002; DESPRES; DAVID; GALLET, 2007; JONES *et al.*, 2010; PUINEAN *et al.*, 2010) todo esse processo ocorre no intestino do inseto.

Essas proteínas podem transformar qualquer produto tóxico, como inseticidas, em produtos químicos menos tóxicos ou não tóxicos para o inseto (YAN *et al.*, 2012). Sendo assim, as glândulas salivares e o intestino são importantíssimos para a vida dos insetos e são peças fundamentais na interação planta-inseto e resistência a compostos tóxicos.

É importante destacar que ainda não existe um controle eficaz para *T. peregrinus*. Inúmeros grupos de pesquisas em todo mundo vêm desenvolvendo trabalhos com a esta finalidade em curto prazo, visto que a utilização de produtos químicos é proibida pelo Conselho Brasileiro de Manejo Florestal (FSC). Já em longo prazo, a utilização de genótipos resistentes é a melhor estratégia a ser adotada. Porém, até os dias atuais, o método de controle que vem sendo empregado é a utilização do controle biológico, visto que não existe registro de genótipos de eucalipto resistentes à praga para o plantio. Deve-se destacar que o nível de controle ainda está muito abaixo do necessário para manter a população do inseto-praga em níveis aceitáveis. Sendo assim se fazem necessários outros tipos de abordagens para descoberta de um controle mais eficaz.

Nesse contexto, a identificação e caracterização dos mecanismos moleculares da praga que causam danos às folhas da planta estudada é de extrema importância para subsidiar táticas de controle populacional do percevejo, principalmente pelo método de resistência de plantas. Técnicas de biotecnologia e biologia molecular auxiliam nesse tipo de abordagem e, dessa forma, a presente pesquisa tem o objetivo de caracterizar e identificar os genes que

estão relacionados aos danos causados ao *T. peregrinus* quando o mesmo se alimenta com genótipos que apresentam uma certa resistência e suscetível de eucalipto.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLTER, C.; JONGSMA, M. A: The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J Insect Physiol**, v. 43, n. 10, p. 885–895, out. 1997.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. **J Insect Physiol**, v. 32, n.10, p. 827-833, 1986.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), **Zootaxa**, Auckland, v. 1228, n.1, p. 61-68, 2006.

DESPRES, L.; DAVID, J. P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório Ibá 2019**. Brasília, DF, 2019. 80 p.

JACOBS, D. H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees: research in action. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

JONES, R. T.; BAKKER, S. E.; STONE, D.; SHUTTLEWORTH, S. N.; BOUNDY, S.; MCCART, C.; DABORN, P. J.; FFRENCH-CONSTANT, R H.; VAN DEN ELSEN, J M. Homology modelling of *Drosophila* cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. **Pest Manag Sci**, 2010, v. 66, n. 10, p. 1106–1115, 1986.

PARDE, V. D.; SHARMA, H C.; KACHOLE, M. S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **J Insect Physiol**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010.

PUINEAN, A. M.; FOSTER, S. P.; OLIPHANT, L.; DENHOLM, I.; FIELD, L. M.; MILLAR, N. S.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. **PLOS Genetics**, v. 6,n.6, p. 1-11, 2010.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R: Evolution of

supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 179–181, 2002.

WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, v. 65, n. 12, p. 1795–1804, 2004.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; NOGUEIRA, DE SÁ, L. A.; BARBOSA, L. R.; DIAS, T. K. R.; FERREIRA-FILHO, P. J.; OLIVEIRA, R. J. R. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2010.

YAN, L.; YANG, P.; JIANG, F.; CUI, N.; MA, E.; QIAO, C.; CUI, F. Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. **BMC Genomics**, v. 13, n. 609, p. 1-18, 2012.

## CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 *Thaumastocoris peregrinus* (PERCEVEJO BRONZEADO)

O percevejo bronzeado é uma praga exótica originária da Austrália e foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2008. Esse inseto-praga vem causando grandes prejuízos nos plantios de eucalipto do mundo inteiro e no Brasil não tem sido diferente. Trata-se de uma espécie do gênero *Thaumastocoris*, no qual estão catalogadas mais de dez espécies. A descrição taxonômica do *T. peregrinus*, foi concretizada pelos pesquisadores Carpintero e Dellapé no ano de 2006 e são percevejos fitófagos (que se alimentam de plantas), os quais medem aproximadamente 3 milímetros, possuem corpo achatado, apresentam antenas com quatro seguimentos, olhos na cor vermelha e placas mandibulares. São insetos que causam danos tanto na fase ninfal quanto adulta (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). Esse inseto apresenta ciclo de vida de aproximadamente 50 dias, onde cada fêmea ovoposita em média 60 ovos que apresentam uma coloração preta, os insetos são bastante rápidos, e apresentam apêndices apicais nas tíbias que conferem a capacidade de grudar em superfícies escorregadias (JACOBS; NESER, 2005; SMANIOTTO, M. A. et al. 2017).

O percevejo bronzeado por ser um inseto sugador de seiva, no ato de sua alimentação causa danos diretos nas folhas de eucalipto provocando um bronzeamento (clorose) das folhas. Essa sintomatologia confere às plantas um aspecto bronzeado que posteriormente ocasiona a queda das folhas e a partir desse sintoma originou-se o nome popular de percevejo bronzeado. Se o ataque for severo, causa o ressecamento da folha e posteriormente a queda, podendo levar a árvore à morte (JACOBS; NESER, 2005; WILCKEN, et al. 2010).

Metabólitos secundários e proteínas de defesa, tais como inibidores de alcalóides, glucosinolatos, glucósidos, espécies reativas de oxigênio, quitinase, proteases e outras proteínas, são detectáveis no floema e tem sido demonstrado exercer efeitos negativos sobre os sugadores de seiva. Diante disso os hemípteros quase sempre têm a necessidade de suprimir as respostas de defesa da planta. Nesse sentido, esse processo é feito através de secreções enzimáticas encontradas normalmente nas glândulas salivares (WALZ et al., 2004). Essa defesa do inseto torna-o muitas vezes resistente aos mecanismos de defesa da planta (DESPRES; DAVID; GALLET, 2007).

## 2 EXPRESSÃO GÊNICA E GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

A expressão gênica pode ser conceituada como o processo onde informações que estão presentes em um gene são traduzidas em proteínas. Neste processo, essa proteína irá expressar as características genéticas do indivíduo em questão e revelar seu fenótipo, sendo esse último o resultado de todos os processos fisiológicos e bioquímicos do organismo estudado (LODISH et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2009; RODRIGUES, 2015).

Através de pesquisas que envolvem estudos e análises da expressão gênica é possível caracterizar genes nas células onde a expressão foi modificada. Sendo assim, as informações sobre os mecanismos de resposta ao estresse é de grande importância para o entendimento da fisiologia do organismo estudado, para que seja possível intervir ou melhorar a tolerância da espécie afetada ao respectivo estresse (GRIFFITHS et al., 2009).

O avanço nas pesquisas em transcrito e expressão gênica têm proporcionado a obtenção de valiosas informações, as quais auxiliam uma melhor compreensão dos processos celulares e fisiológicos. Desta forma, para a análise dos processos de expressão gênica e regulação transcricional dos genomas, inúmeras técnicas e ferramentas biotecnológicas estão disponíveis (VELCULESCU et al., 1995; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; MORGANTE, BLAWID, 2016). Dentre elas, a PCR Quantitativa em Tempo Real de Transcrição Reversa (RT-qPCR) é uma técnica altamente sensível que se tornou padrão para a análise de diferenças na expressão gênica, sendo útil para a interpretação funcional dos genes e quantificação dos perfis de expressão, a qual fornece informações sobre os genes que estão sendo expressos ou reprimidos em um organismo. Ou seja, a RT-qPCR consiste na técnica de quantificação dos RNAs oriundos da expressão genética diferencial (LEUNG; CAVALIERI, 2003; MOREIRA, 2010). Essa técnica tem sido bastante utilizada para demonstrar resposta induzida por herbívoros nas plantas. Com a resposta, é possível obter dados relacionados aos genes envolvidos nas alterações fisiológica e metabólicas, indicando mecanismo de resposta.

Pesquisas que englobam as defesas indiretas das plantas e sua função na interação tritrófica entre plantas – herbívoros – parasitoides / predadores têm indicado grande importância no setor agrícola e florestal devido seu alto potencial econômico. Esses estudos mostram toda a interação química entre o inseto e a planta por meio da compreensão dos genes envolvidos na resposta da planta. Assim, através do conhecimento dessa interação é possível conhecer os mecanismos de resistência nas plantas contra uma determinada praga (MOREIRA, 2010; ADPTA, 2016).

A resistência de plantas vem sendo bastante utilizada no manejo integrado de pragas, com o objetivo de diminuir os danos ocasionados pelo inseto. Neste caso o mesmo não se alimenta ou, quando se alimenta, as plantas liberam compostos que o prejudica, sendo passivo na produção de moléculas menos nocivas ao meio ambiente e incapaz de promover a desintoxicação (HEINZ; ZALOM, 1995; NORMAN et al., 1996; PRADO, 2014).

### 3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT-QPCR

A expressão gênica pode ser analisada com diferentes técnicas moleculares. Uma dessas ferramentas que vem ganhado destaque é a PCR Quantitativa em Tempo Real de Transcrição Reversa - RT-qPCR, por quantificar de forma simples o mRNA (RNA mensageiro) (RODRIGUES, 2015).

A RT-qPCR é considerada uma técnica quantitativa que consiste na amplificação e quantificação dos níveis de transcrição de mRNA. Essa análise é feita através da emissão de sinais de fluorescência capturado por um sistema óptico, sendo todo esse processo realizado através de diferentes amplificações por *software* juntamente com um termociclador (GINZINGER, 2002; MACKAY, 2004; GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; CASTRO, 2009). Há um grande número de fluoróforos e sondas que podem ser empregados na técnica de RT-qPCR, a exemplo do corante intercalante SYBR Green e das sondas Taqman, Molecular Beacons e Scorpions (GINZINGER, 2002; GIULIETTI et al., 2001; CASTRO, 2009).

A RT-qPCR é semelhante à PCR convencional, onde ocorre a reação em ciclos subsequentes de: (1) desnaturação do DNA em fitas simples por aquecimento a 90-95 °C; (2) anelamento de primers a sequências complementares específicas nas fitas simples de DNA e; (3) extensão de novas fitas complementares, mediada por uma enzima DNA polimerase termoestável, resultando em um aumento exponencial do número de amplicons ao longo dos ciclos da reação (MORGANTE, BLAWID, 2016).

São inúmeros os benefícios da RT-qPCR, e entre eles destaca-se, a produção de dados quantitativos com um intervalo dinâmico e preciso, além de não ser necessária a manipulação pós amplificação, sendo capaz de detectar de forma confiável uma única cópia de um transcrito, e também da diferença da expressão gênica. Essa técnica tem outro ponto bastante positivo que é a utilização de uma quantidade pequena de RNA modelo quando comparada a outros métodos de análise de expressão gênica (WONG; MEDRANO, 2005; BASSAN, 2017). Porém é uma técnica com o custo elevado e se faz necessária a utilização de normalizadores para avaliar a veracidade dos resultados (BUSTIN, et al., 2009; BASSAN, 2017). A utilização dos genes de referência tem se mostrado bastante importante, ao auxiliar na correção de possíveis erros que possam à acontecer durante o procedimento do experimento (HUGGETT et al., 2005; BASSAN, 2017).

Os genes de referência são considerados uma forma de controle que é atingido por meio da normalização dos valores de expressão gênica adquiridos na RT-qPCR. Esses genes se mantêm estáveis nas condições a serem comparadas (CZECHOWSKI, et al., 2005; ARENA, 2014).

A exatidão dos resultados da RT-qPCR pode ser afetada por variações da técnica, juntamente com o processo de montagem do experimento. Porém, as variações podem ser controladas através da normalização dos resultados, pela seleção adequada dos genes de referência ou genes endógenos, tornando assim mais confiável os resultados obtidos (GUTIERREZ et al., 2008; RODRIGUES; 2015). Assim a escolha dos genes de interesse e dos endógenos é um dos pontos mais importantes em uma pesquisa dessa natureza.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS – APTA. **DOCUMENTO TÉCNICO 23: Mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores**. Campinas: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 2016. 13 p.
- ARENA, G. D. **Análise da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao *Citrus leprosis virus C* e ao seu vetor *Brevipalpus phoenicis***. 2014. 143 f. Dissertação (Mestre em Ciência), Escola Superior Agrícola "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- BASSAN, M. M. **Genes de referência de *Diaphorina citri* para estudos de expressão gênica quantitativa e seu controle por RNAi em laranja doce**. 2017. 92 f. Tese (Doutor em Ciência), Escola Superior Agrícola "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAM, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, New York, v. 55, n. 4, p. 611– 622, 2009.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), **Zootaxa**, Auckland, v. 1228, n.1, p. 61-68, 2006.
- CASTRO, T. L. de P. **AValiação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestre em Genética), Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K; SCHEIBLE, W.F. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 139, p. 5-17, 2005.
- DESPRES, L.; DAVID, J. P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies?. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n. 402, p. 1445-1454, 2004.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n.6, p. 503–512, 2002.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 386–401, 2001.



GRIFFITHS, A. J. R.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à Genética**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712p.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUÉNIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.-F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. L. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609-618, 2008.

HEINZ, K. M.; ZALOM, F. Variation in trichome based resistance to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition on tomato. **Journal of Economic Entomology**, College Park, Lanham, v.88, n. 5, p. 1494-1502, 1995.

HUGGET, J.; DHEDA, K; BUSTIN. S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation: strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v.6, n. 4, p. 279-284, 2005.

JACOBS, D. H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees: research in action. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

LAIA, M. L.; GERHARDT, I. R.; ABAD, J. I. M.; DEGENHARDT-GOLDBACK, J.; GONÇALVES, J. F.; MISSIAGGIA, A. A. A Biotecnologia e o Eucalipto do Futuro. In: VALE, A. B.; MACHADO, C. C.; PIRES, J. M. M.; VILAR, M. B.; COSTA, C. B.; NACIF, A. P. (Eds). *Eucaliptocultura no Brasil: Silvicultura, manejo e ambiência*. Viçosa, MG: SIF, 2014. p. 39-68.

LEUNG, Y.F.; CAVALIERI, D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 649-658, 2003.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054p.  
MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin Microbiol Infect.**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MOREIRA, L. S. D. **Expressão gênica e voláteis induzidas pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera: Noctuidas) em milhos, *Zea mays* L. (Poaceae)**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestre em Ciência) - Escola Superior Agrícola "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos**. Embrapa Semiárido, 2016. 63p.

NORMAN, J. R. J. W.; RILEY, D. G.; STANLEY, P. A.; ELLSWORTH, P. C.; TOSCANO, N. C. **Management of Silverleaf Whitefly**: a comprehensive manual on the biology, economic impact and control tactics. Washington: USDA, 1996. 22 p.

PRADO, J. C. **RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE ALGODOEIRO A *BEMISIA TABACI* BIÓTIPO B**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico, Campinas, 2014.

RODRIGUES, A. C. P. **Identificação de genes diferencialmente expressos em híbridos de eucalyptus sp. Afetados por anomalias morfológicas e fisiológicas de causa desconhecida.** 2015. 70 f. Dissertação (Mestre em Ciência Florestal), Engenharia Florestal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

SMANIOTTO, M. A.; SILVA, A.; CUNHA, U. S.; GARCIA, M. S. BIOLOGIA DE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO E DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EM DEZ ESPÉCIES DE EUCALIPTO. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p.679-685, 2017.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, D.C., v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.  
WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, v. 65, n. 12, p. 1795–1804, 2004.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; NOGUEIRA DE SÁ, L. A.; BARBOSA, L. R.; DIAS, T. K. R.; FERREIRA-FILHO, P. J.; OLIVEIRA, R. J. R. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2010.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, Natick, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

## CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *Thaumastocoris peregrinus*

### RESUMO

Conhecido popularmente como Percevejo bronzeado, o *Thaumastocoris peregrinus* é uma praga que tem causado severos danos em plantações de eucalipto em todo mundo. Por se tratar de uma praga recente, poucos são os estudos relacionados ao seu controle. Atualmente, com o avanço da biologia molecular, inúmeras são as técnicas que podem auxiliar na descoberta de uma forma eficaz de controle, que seja menos prejudicial ao meio ambiente. As diferentes técnicas de análise da expressão gênica se iniciam com a extração do RNA total do material em estudo. Para análises de genômica funcional, é indispensável que o RNA esteja íntegro. Uma variedade de protocolos de extração de RNA de insetos está disponível, porém nenhum deles é amplamente eficaz, pois vários fatores e características intrínsecas do tecido a ser analisado podem afetar esta integridade e qualidade do material extraído. Assim, quase sempre é necessário adaptar e modificar os protocolos com a finalidade de otimizar a extração dos ácidos nucleicos. Este estudo objetivou analisar a eficiência de três métodos para extração de RNA total de *Thaumastocoris peregrinus*: o Kit comercial “RNeasy Mini-kit” (Qiagen), o protocolo que utiliza o reagente comercial D-Sorbitol (Sigma) e o outro protocolo que utiliza o Tris reagente (Sigma), bem como, indicar qual é o método mais eficaz para uso em insetos. Os resultados obtidos demonstraram que o RNA extraído com o método do Kit comercial “RNeasy Mini-kit” foi o único protocolo capaz de aliar a quantidade, qualidade e integridade do RNA extraído à repetibilidade da técnica. No entanto, ele pode ser facilmente substituído pela utilização de D-Sorbitol (Sigma) devido ao seu baixo custo, fazendo-se necessárias adaptações que permitam a obtenção de uma maior quantidade de RNA extraído. Dos três protocolos testados apenas o Tris reagente (Sigma), não foi eficiente na extração de RNA do *T. peregrinus*. Considerou-se o *RNeasy Mini Kit (QIAGEN)* como método preferencial para extração de RNA em *T. peregrinus*. Salienta-se que a determinação de um protocolo eficiente para a extração de RNA do *T. peregrinus* irá auxiliar em pesquisas futuras, a exemplo da expressão gênica e técnicas como a RNAseq, que auxiliam na descoberta de genes presentes na amostra de RNA extraído.

**Palavras Chave:** Ácido ribonucleico. Percevejo bronzeado. *Eucalyptus*.

## ABSTRACT

Popularly known as Tanbug, *Thaumastocoris peregrinus* is a pest that has caused severe damage to eucalyptus plantations worldwide. As it is a recent pest, there are few studies related to its control. Currently, with the advancement of molecular biology, there are countless techniques that can assist in the discovery of an effective form of control, which is less harmful to the environment. The different techniques of analysis of gene expression start with the extraction of the total RNA from the material under study. For functional genomics analysis, it is essential that the RNA is intact. A variety of insect RNA extraction protocols are available, but none of them are widely effective, as several factors and intrinsic characteristics of the tissue to be analyzed can affect this integrity and quality of the extracted material. Thus, it is almost always necessary to adapt and modify the protocols in order to optimize the extraction of nucleic acids. This study aimed to analyze the efficiency of three methods for extraction of total RNA from *Thaumastocoris peregrinus*: the commercial kit “RNeasy Mini-kit” (Qiagen), the protocol that uses the commercial reagent D-Sorbitol (Sigma) and the other protocol that uses the reagent Tris (Sigma), as well as, indicate which is the most effective method for use in insects. The results obtained demonstrated that the RNA extracted with the commercial kit method “RNeasy Mini-kit” was the only protocol capable of combining the quantity, quality and integrity of the extracted RNA with the repeatability of the technique. However, it can be easily replaced by the use of D-Sorbitol (Sigma) due to its low cost, making adaptations necessary to obtain a greater amount of extracted RNA. Of the three protocols tested, only the reagent Tris (Sigma) was not efficient in extracting RNA from *T. peregrinus*. The RNeasy Mini Kit (QIAGEN) was considered as the preferred method for RNA extraction in *T. peregrinus*. It should be noted that the determination of an efficient protocol for the extraction of RNA from *T. peregrinus* will assist in future research, such as gene expression and techniques such as RNAseq, which assist in the discovery of genes present in the extracted RNA sample.

**Key words: Ribonucleic acid. Tan bug. Eucalyptus.**

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de eucalipto assume a cada dia, maior destaque na economia do Brasil. Inúmeros são os avanços alcançados em nível de produtividade e crescente tem sido a área total plantada de 6,97 milhões de hectares (IBÁ, 2020). No entanto, desde a sua introdução no país para fins comerciais, as espécies de eucalipto têm sofrido com o ataque de pragas e doenças. Dentre estas tem-se o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), detectado no ano de 2008, na cidade de São Francisco-RS. O percevejo bronzeado é uma praga exótica que se adaptou às condições ambientais e disseminou-se por todo território brasileiro, provocando danos diretos às plantas de eucalipto, fato que ocasionou aumento considerável nos custos de produção e gerou graves prejuízos comerciais (WILCKEN et al., 2010).

Por se tratar de uma espécie fitófaga, ao se alimentar, o percevejo bronzeado perfura as folhas e ramos finos para sugar a seiva, provoca um prateamento das folhas e, posteriormente, as folhas ficam com o aspecto bronzeado e sofrem abscisão, com consequente redução da área fotossintética da planta. Em caso de ataques severos pode levar a planta a morte (JACOBS; NESER, 2005; WILCKEN, 2010)

A identificação e caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de injúria na folha, por meio do ataque do inseto, são de suma importância para subsidiar estratégias de controle populacional de *T. peregrinus*, viabilizando o entendimento dos mecanismos de resistência de algumas plantas e sua interação com a praga. Sendo assim, o emprego de técnicas da biologia molecular que possibilitem a análise da expressão gênica podem favorecer essa abordagem.

Estudos na área de biologia molecular têm evoluído rapidamente mostrando-se úteis na quantificação de padrões de expressão. No entanto, as inúmeras técnicas de análise da expressão gênica atualmente disponíveis requerem diretamente a obtenção de boa qualidade e quantidades adequadas da extração de RNA puro e íntegro (ARAS; DURAN; YENILMEZ, 2003). Estas etapas são essenciais para uma análise quantitativa comparativa.

Os procedimentos de extração não são absolutamente reproduzíveis para todas as espécies, uma vez que, existem os mais diversos tipos de tecidos e células (GOUVEIA; REGITANO, 2007), além de tudo, é imprescindível acumular uma quantidade considerável de RNA para alguns procedimentos, o que pode se tornar complicado com pequenos insetos, como é o caso do *T. peregrinus*.

Na prática, os procedimentos são empíricos, pois, é indispensável realizar adaptações e modificações nos protocolos (CHIARI; VALLE; RESENDE, 2009), sendo fundamental utilizar metodologias particulares, com a finalidade de otimizar a extração do RNA de uma amostra de boa qualidade (WALDSCHMIDT et al., 1997). Outrossim, o protocolo em uso deve ser apropriado ao objetivo que será dado à extração do ácido nucleico, tais como a sua utilização em procedimentos de PCR Quantitativa em Tempo Real de Transcrição Reversa (RT-qPCR), sequenciamento, clonagem, expressão gênica, entre outros, para que os resultados sejam propícios e aceitáveis à aplicação (BARTLETT; STIRLING, 2003). A análise de RNA, com suporte de tais técnicas pode fornecer informações relevantes sobre expressão gênica do material em estudo (IBELLI; REGITANO; NICIMURA, 2007).

As metodologias para extração e isolamento de RNA, em síntese, integram três estágios: o inicial constitui-se na lise e desnaturação celular, etapa na qual transcorre a extração propriamente dita, as membranas celulares são rompidas e, conseqüentemente, os ácidos nucleicos totais são dispersos no meio. A dificuldade predominante na extração de RNA é devido à presença de ribonucleases (RNases) estáveis e ativas nos tecidos, logo, é suscetível que o material em análise seja rapidamente degradado (BITENCOURT et al., 2011). Dessarte, o uso de tampões de extração é extremamente necessário nessa fase, em virtude de impedirem a ação de RNases (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). O segundo estágio, consiste na separação do RNA de outros componentes celulares indesejados, como por exemplo restos de membrana, proteínas e DNA; em outras palavras, é a fase de purificação do RNA em solução. Na terceira e última etapa, o RNA deve ser precipitado, geralmente com o uso de álcoois (etanol ou isopropanol) para garantir a máxima pureza do material (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

Com a premissa de assegurarem uma extração de RNA de alta qualidade a partir de pequenas quantidades de material biológico, numerosos kits comerciais são fabricados, e em sua maior parte, são de fato eficientes, no entanto é primordial observar a viabilidade para a espécie e tecido que se deseja trabalhar (BITENCOURT et al., 2011). Diferentes protocolos e reagentes para a extração de RNA de artrópodes foram descritos em diversos estudos, porém para extração especificamente do *T. peregrinus* não se mostraram eficientes.

Considerando-se a dificuldade em obter fontes de resistência para melhoramento genético do eucalipto para a praga em foco e as limitações na eficiência e durabilidade dos tratamentos químicos e de controle biológico, um método alternativo promissor de controle como o silenciamento gênico por RNA interferente (RNAi) pode ser desenvolvido. No

entanto, as sequências de genômica e a transcritômica de *T. peregrinus* necessárias para a seleção de genes-alvo ainda são desconhecidas. O presente trabalho objetivou o estabelecimento de protocolos para a obtenção da extração do RNA total das amostras de percevejo bronzeado, com o uso dos reagentes *TRI* e D-Sorbitol, ambos da fabricante Sigma e também do Kit comercial “RNeasy Mini-kit” da Qiagen, tendo em vista o fato de não haver referências de extração do transcritoma do inseto na literatura.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

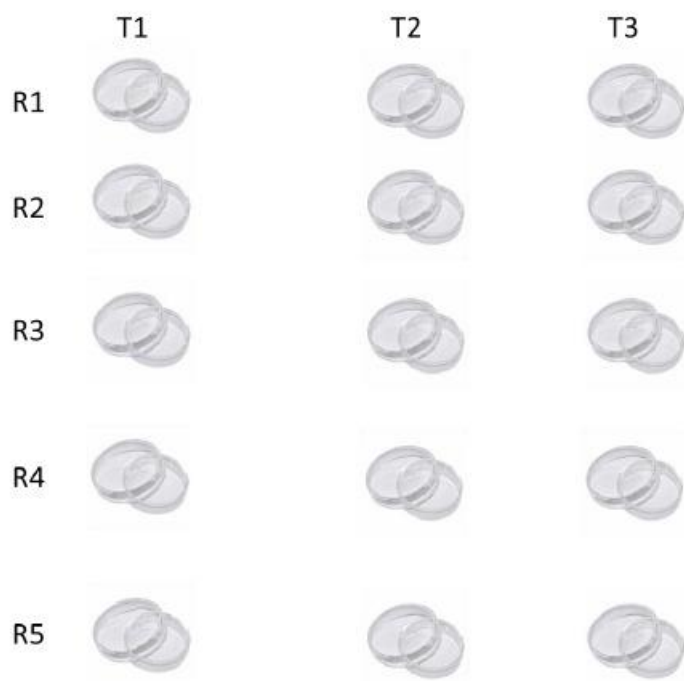
Os insetos adultos de *T. pregrinus* foram coletados em condições de campo nas plantas de eucalipto nas dependências do campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, situado na cidade de Diamantina-MG. Posteriormente, foram liberados 5 (cinco) insetos em 7 (sete) placas de Petri (5 por placa), onde ficaram sob jejum de 2 horas. Em seguida os insetos de uma placa foram transferidos para um tubo de Eppendorf e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Assim foram armazenados em ultrafreezer - 80 °C, a fim de manter a integridade das amostras, facilitar os processos de extração e manter estáveis as condições metabólicas referentes ao processo de ataque do *T. pregrinus*. Para os insetos restantes nas outras 6 (seis) placas de Petri foram acrescentadas folhas de eucalipto devidamente higienizada de genótipos resistente e suscetível fornecido pela empresa Gerdau. Após 4 horas de alimentação os insetos foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e levados para a extração do RNA, imediatamente (Figura 1 e 2).

Figura 1 - Percevejo bronzeado, visão geral.





Figura 2 - Desenho do delineamento experimental. T1: Amostras extraídas usando (Protocolo 01: TRI Reagente® - SIGMA com modificações descritas. T2: Amostras extraídas usando (Protocolo 02: DSorbitol - SIGMA). T3: Amostras extraídas usando (Protocolo 03: RNeasy Mini-kit - Qiagen) R1, R2, R3, R4 e R5 são as repetições.



Fonte. Autor, 2020.

Três protocolos empregados para extração de RNA total de insetos foram utilizados no experimento, sendo:

**Protocolo 01:** TRI Reagent® - **SIGMA** com modificações descritas

Em microtubos de centrifugação (Eppendorf) de 1,5 mL foram depositados 5 insetos e 1000 µL do tampão trizol® (Sigma); em seguida 3 microesferas (beads) foram acrescentadas ao tubo. Com o auxílio de um Disruptor mecânico (Mini-Beadbeater™) procedeu-se com a extração do RNA total. Feito isso, as amostras foram incubadas por 5 minutos sobre gelo, em seguida, 200 µL de clorofórmio foram acrescentados e os microtubos agitados por 15 segundos via inversão manual, prontamente foram incubados por mais 15 minutos sobre gelo.

Posteriormente, as amostras foram levadas a centrifuga durante 15 minutos a 4 °C e a 10351 x g. O próximo estágio consistiu na lavagem do material e para isso o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionou-se 500 µL de isopropanol. A solução foi misturada via inversão e incubada por 10 minutos sobre gelo. Em seguida, a amostra foi submetida à nova centrifugação por mais 10 minutos a 4 °C e a 10351 x g. Nessa etapa, o

sobrenadante foi retirado de forma que restasse apenas o material precipitado (Pellet) e imediatamente adicionou-se 1000  $\mu\text{L}$  de etanol 75%, misturou-se via inversão por aproximadamente 15 segundos e novamente centrifugou-se, desta vez por 5 minutos a 4 °C e a 8000 x g .

O sobrenadante foi novamente descartado e o material precipitado seco por 10 minutos em um dessecador a vácuo ou em câmara de fluxo laminar. Ao material seco, foram adicionados 35  $\mu\text{L}$  de água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPC), em razão de ser um forte inibidor da atividade da RNase.

### ***Protocolo 02: D-Sorbitol - SIGMA***

Em microtubos de centrifugação (Eppendorf) de 1,5 mL foram adicionadas 3 microesferas (beads) juntamente com até 15 mg de insetos e agitados no Disruptor (Mini-Beadbeater™). Em seguida foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem D-Sorbitol e 15  $\mu\text{L}$  de 2- $\beta$ mercaptaetanol ( $\beta$ -ME) por amostra e misturou-se via agitação no Disruptor (Mini-Beadbeater™) durante 10 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por um período de 5 minutos a 5000 x g.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem repetido por no mínimo mais uma vez, ou até o tampão não apresentar nenhuma suspensão. Nessa etapa, foram adicionados 120  $\mu\text{L}$  de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), pré-aquecido à 65 °C, juntamente com 7  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -ME por amostra. A solução foi homogeneizada via agitação com o auxílio do Disruptor (Mini-Beadbeater™) por 10 segundos e, logo após, incubada em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, com homogeneização por inversão manual a cada 10 minutos.

Por conseguinte, o material foi resfriado sobre gelo por 5 minutos, e após isso, foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool islamítico (CIA 24:1), seguido por agitação durante 10 segundos no Disruptor (Mini-Beadbeater™) e centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Prontamente, foram transferidos cerca de 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um novo microtubo, adicionados 700  $\mu\text{L}$  de CIA, a solução foi agitada outra vez por 10 segundos no Disruptor (Mini-Beadbeater™) e levada para ser centrifugada por 10 minutos a 4 °C e a 13000 x g.

Após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 1/3 do volume de isopropanol (álcool isopropílico) gelado, a solução foi misturada via inversão e os tubos armazenados a -20 °C pelo período mínimo de 1 hora.

Foi realizada uma centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado de forma que restasse apenas o material precipitado (Pellet) e imediatamente adicionou-se 1000 µL de etanol 70%; novamente foi realizada uma centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi novamente descartado e o material precipitado seco por 10 minutos em um dessecador a vácuo ou em câmara de fluxo laminar.

### ***Protocolo 03: RNeasy Mini-kit – Qiagen***

Antes de começar a extração propriamente dita realizaram-se:

Adição de 10 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) ou 20 µL de 2 M ditioneitol (DTT) a 1mL de tampão RLT.

Adição de 4 volumes de etanol (96–100%) ao Buffer RPE para uma solução de trabalho.

1. No máximo 30 mg de tecido foram macerados com o auxílio de microesferas metálicas com BUFFER RLT e posteriormente completou o volume apropriado de Buffer, conforme descrito pelo fabricante (Figura 3). Os tubos foram centrifugados por um período de 3 minutos na velocidade 13.000 x g.

Figura 3 - Volumes de tampão RLT para a ruptura e homogeneização da amostra.

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT	Disruption and homogenization
Animal cells	$<5 \times 10^6$	$<6$ cm	350 µl	Add Buffer RLT, vortex ( $\leq 1 \times 10^5$ cells); or use QIAshredder, TissueRuptor®, or needle and syringe
	$\leq 1 \times 10^7$	6–10 cm	600 µl	
Animal tissues	$<20$ mg	–	350 µl*	TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder or needle and syringe
	$\leq 30$ mg	–	600 µl	

Fonte. Protocolo do fabricante (Qiagen).

2. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta, adicionado 1 volume de etanol 70% ao lisado e outra vez a solução foi homogeneizada com o auxílio da pipeta, não sendo recomendado pelo fabricante realizar a centrifugação. Para essa etapa, foi necessário transferir 700 µL da amostra, incluindo qualquer precipitado, para uma spin RNeasy Mini coluna previamente colocada em tubo de recolha de 2 mL (fornecido no kit) e o material foi centrifugado a  $\geq 8000$  x g por 15 segundos. Ao final, o tubo foi descartado

e à coluna RNeasy foram adicionados 350 µL de tampão RW1 e as amostras centrifugadas a  $\geq 8000 \times g$  por 15 segundos. A solução residual foi descartada e a coluna retornada para o tubo.

Concomitantemente, foram adicionados 10 µL de solução estoque de DNase I (obtida pela adição de 550 µL de água isenta de RNase e homogeneização por inversão manual) a 70 µL de Tampão RDD. A solução foi homogeneizada suavemente por inversão e centrifugada brevemente. Feito isso, 80 µL da mistura de incubação da DNase foram adicionados diretamente à membrana da coluna RNeasy e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos.

3. Foram adicionados 10 µL de solução estoque de DNase I (obtida pela adição de 550 µL de água isenta de RNase e homogeneização por inversão manual) a 70 µL de Tampão RDD. A solução foi homogeneizada suavemente por inversão e centrifugada brevemente. Feito isso, 80 µL da mistura de incubação da DNase foram adicionados diretamente à membrana da coluna RNeasy e as amostras incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos.

4. Foram adicionados 350 µL de tampão RW1 à coluna RNeasy. A solução foi centrifugada a  $\geq 8000 \times g$  por 15 segundos e, logo após, procedeu-se o descarte do fluxo. A coluna RNeasy foi retornada ao tubo e adicionou-se 700 µL de tampão RW1, com posterior centrifugação a  $\geq 8000 \times g$  pelo período de 15 segundos, com posterior descarte do fluxo. Ao final desse período 500 µL de buffer RPE foram adicionados à coluna de rotação RNeasy. A tampa foi fechada e a solução centrifugada a  $\geq 8000 \times g$  por 15 segundos, com novo descarte do fluxo. Em seguida, foram adicionados 500 µL de Buffer RPE à coluna de rotação RNeasy, seguido de centrifugação a  $\geq 8000 \times g$  por 2 minutos.

5. A fim de secar a coluna, realizou-se uma centrifugação em  $13.000 \times g$  por 1 min. Em seguida, cada coluna de centrifugação RNeasy foi transferida para um novo tubo de coleta de 1,5 mL, onde adicionou-se 50 µL de água isenta de RNase diretamente na membrana da coluna e procedeu-se uma centrifugação a  $\geq 8000 \times g$  por 1 minuto, a fim de diluir o RNA precipitado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

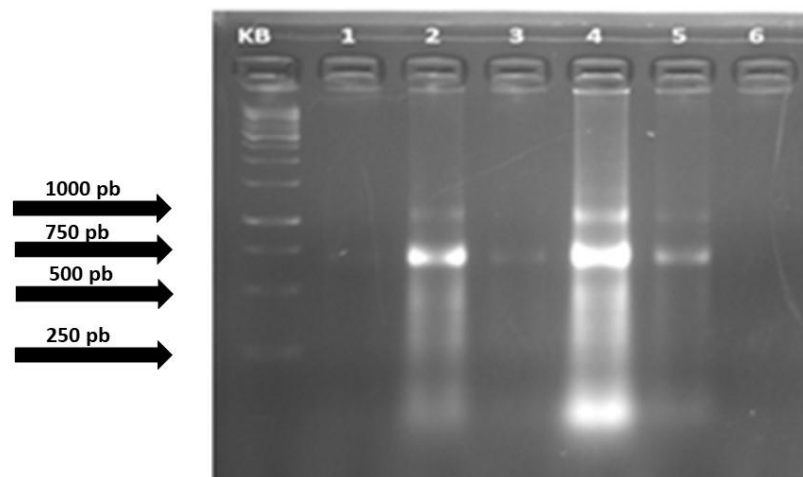
Foi observada diferença na eficiência dos três protocolos testados quanto a qualidade e a quantidade do RNA extraído. A análise por eletroforese permitiu verificar que a separação das bandas dos diferentes tipos de RNAs foi facilmente observada para os três protocolos (Figura 4, 5 e 6).

Porém, a extração realizada com o Kit comercial “*RNeasy Mini-kit*” (Qiagen) apresentou bandas mais nítidas e intensas, para todas as amostras analisadas (Figura 6). Embora com menor intensidade de bandas, a extração com o D-Sorbitol (SIGMA) também permitiu um padrão invariável de qualidade de RNA total, para todas as amostras (Figura 5).

Dentre os protocolos testados, apenas o protocolo 01, com o uso do TRIS reagente (SIGMA), apresentou variabilidade de intensidade de bandas em função da amostra usada para a extração, não sendo observadas bandas nítidas para as amostras 1 e 6 (Figura 4). Destaca-se ainda, que apenas no gel referente ao protocolo 03 (Figura 6), não foi possível verificar a presença de bandas de DNA, sendo o mais indicado para possíveis reações futuras. Os resultados da eletroforese revelam que os melhores protocolos para a extração de RNA total, tendo-se como base estimada o sucesso da extração a partir dos diferentes materiais, foram os protocolos 02 e 03, os quais apresentaram RNA com padrão de banda desejado no gel de agarose com bandas visíveis e sem arraste, indicando maior integridade do RNA obtido. Foi observada diferença na eficiência dos três protocolos quanto à quantidade e qualidade do RNA extraído para *T. peregrinus*.

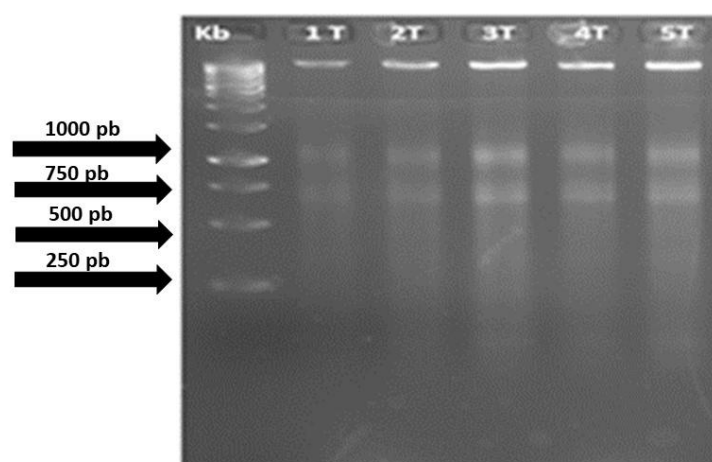
Para a realização de estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos é necessário que o RNA seja extraído e purificado eficientemente, de tal maneira que sua integridade e qualidade sejam mantidas. Necessita também que o processo de extração seja seguro, de fácil execução, baixo custo e que permita sua repetibilidade (DENG et al., 2005; IBELLI; REGITANO; NICIMURA, 2007).

Figura 4 - Gel de eletroforese de RNA *T. peregrinus* com Protocolo 01: TRI Reagent ®. - SIGMA.



Fonte. Autor, 2020.

Figura 5 - Gel de eletroforese de RNA *T. peregrinus* com Protocolo 02: D-Sorbitol – SIGMA.

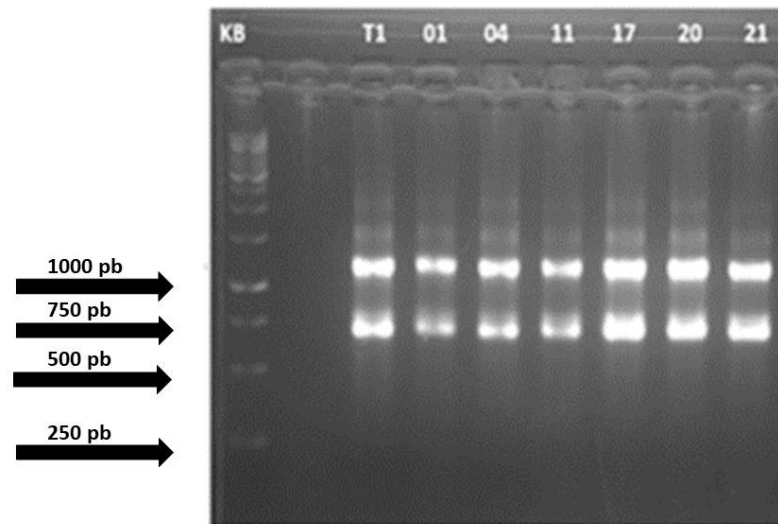


Fonte.

Autor,

2020.

Figura 6 - Gel de eletroforese de RNA *T. peregrinus* com Protocolo 03: RNeasy Mini-kit ..QIAGEN.



Fonte. Autor, 2020.

As técnicas disponíveis para a extração de RNA são inúmeras e apesar de suas variações, têm por princípio básico a lise das membranas lipídicas por uma solução detergente, seguida da purificação, precipitação e eluição do RNA. A exposição do material genético a tampões de extração, etapa inicial do processo, auxilia na precipitação do RNA e na manutenção de sua integridade nas etapas posteriores da extração, por meio da degradação das RNases endógenas, atividades que são possíveis em função da presença de compostos como o cloreto de lítio e tiocianato de guanidina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Os vários reagentes comercialmente disponíveis possuem em suas composições substâncias combinadas, como isotiocianato de guanidina e fenol, que possibilitam uma extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garante a integridade do material. Porém, faz-se necessário o emprego de outros reagentes nas etapas subsequentes para auxiliar no processo de purificação das amostras, tais como o clorofórmio que solubiliza os lipídios e permite a sua remoção das moléculas de RNA.

Uma técnica ideal de extração deve permitir a obtenção de grande quantidade de RNA puro e íntegro, ser de fácil e rápida execução, e, ainda, reprodutível, além de apresentar baixo custo e ser capaz de possibilitar a extração de grande número de amostras simultaneamente. No entanto, nem todas as técnicas disponíveis reúnem todas essas características conjuntamente. Cada técnica tem vantagens e desvantagens que devem ser

revisadas antes de um laboratório decidir qual delas lhe é mais adequada, o que torna de fundamental importância trabalhos que realizem testes de protocolos em função do tecido e/ou espécie objeto de estudo.

No presente estudo, os três protocolos testados apresentam diferentes tampões de extração, com características peculiares que buscam manter a integridade do RNA durante todo o processo de extração da molécula. A vantagem destes reagentes é que eles são comercializados prontos para uso, o procedimento é rápido e direto, e eles promovem a desnaturação rápida das ribonucleares e estabilização do RNA.

Dentre os processos testados, a extração de RNA com o TRIS (SIGMA) é considerada uma das formas mais simples e mais usadas para extrair o RNA a partir de células ou tecidos. Baseado na técnica de Chomczynski e Sacchi (1987) e comercialmente disponível, o TRI Reagente® oferece a possibilidade de extração simultânea do DNA e das proteínas presentes na amostra. Trata-se de uma solução monofásica de fenol e isotiocianeto de guanidina que rompe as células e dissolve os componentes celulares.

Apesar de apresentar as vantagens de ser um reagente pronto para uso e um procedimento rápido e direto, capaz de promover a rápida desnaturação de RNases e estabilização do RNA, este protocolo (Protocolo 01) não apresentou resultados satisfatórios para a extração de RNA de *T. pergerinus*. A ineficiência em extrair o RNA das diferentes amostras do inseto usadas no processo foi evidenciada pela ausência de bandas de RNA ribossomal observada na imagem do gel de agarose, para as amostras 01 e 06, bem como, pela fraca intensidade das bandas para as amostras 03 e 05 (Figura 4), já que a presença de bandas de RNA ribossomal nítidas e de alta intensidade (28 S e 18 S), no gel de agarose, é um indicativo da boa qualidade e integridade do RNA extraído.

A análise por eletroforese em gel de agarose permitiu verificar, também, que as duas únicas amostras que apresentaram bandas intensas (amostras 02 e 04), também, apresentaram “rastros” intensos, que permitem inferir a existência de contaminação e possível degradação das amostras. Além disso, verificou-se, ainda que pouco evidente, a presença da banda de DNA, fato que está diretamente ligado à incapacidade do Trizol de remover o DNA de plasmídeos e fragmentos de DNA, sendo capaz de remover eficientemente apenas as moléculas grandes desse ácido nucleico.

Em suma, apesar da homogeneização das amostras de *T. peregrinus* obtida mediante uso do Disruptor mecânico (Mini-Beadbeater™), equipamento que provoca perturbações celulares por meio de impactos constantes e de alta velocidade e torna o processo de homogeneizar e extrair o RNA extremamente eficiente ao garantir um maior



contato com o reagente Trizol, em tese deveria garantir uma melhor desnaturação das proteínas teciduais, bem como, o emprego das baixas temperaturas com vistas a interromper a atividade enzimática das RNases. Não foi possível obter amostras de RNA com elevada qualidade com o uso do TRI reagente, que se mostrou, ainda, uma técnica pouco reprodutível ao permitir a extração de RNA de apenas duas amostras, dentre as seis analisadas.

Extrações realizadas com TRI reagente, seguindo as recomendações do fabricante, a depender do tecido e/ou espécie, podem apresentar baixo rendimento e, conseqüentemente, alta contaminação devido à presença de proteínas e compostos fenólicos (JAAKOLA et al., 2001; MARTINS et al., 2018). Por se tratar de um reagente composto por fenol, quando usado em proporções reagente/tecido inadequadas pode também causar danos a cauda poli-A do mRNA extraído (AZEVEDO; LINO-NETO; TAVARES, 2003), o que pode dificultar análises posteriores. Além disso, os fragmentos de DNA que não são removidos no processo de extração com o TRI reagente podem comprometer procedimentos que dependem de um alto rendimento de RNA como a reação em cadeia da polimerase via RT-PCR.

Em contra partida, a exemplo do realizado na aplicação do Protocolo 02 (D-Sorbitol – SIGMA) neste estudo, muitos protocolos têm se baseado em modificações do protocolo clássico de extração com brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1987) para melhorar a pureza e o rendimento da extração de DNA e RNA. Dentre estas modificações o uso de solução a base de sorbitol, para realizar uma pré-lavagem do tecido a ser analisado, tem permitido redução da quantidade de contaminantes extracelulares e a obtenção de amostras de RNA de alta qualidade e integridade (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993) com amostras de diversos tecidos e espécies.

O uso do D-Sorbitol, no presente estudo, promoveu obtenção de amostras de RNA íntegras e, aparentemente, livres de polifenóis e polissacarídeos. O que pode ser inferido com base na ausência de “rastros” e na nitidez das bandas na imagem do gel de agarose (FIGURA 5). No entanto a baixa intensidade das bandas observadas evidencia, também, uma baixa quantidade de RNA extraído, o que pode ser indesejado a depender da técnica de análise da expressão gênica posteriormente empregada. Outro ponto a ser ressaltado, refere-se à presença de bandas intensas de DNA observadas em todas as amostras processadas com o protocolo 02.

Assim, a análise por eletroforese do gel de agarose demonstrou que o uso do D-Sorbitol juntamente com o 2- βmercaptoetanol, que auxilia na redução da oxidação dos pellets de RNA, constitui-se em uma técnica reprodutível e que fornece amostras de RNA com alta integridade, sendo necessários, porém, ajustes que permitam a obtenção de uma maior

concentração de RNA, ao final do processo, e um posterior tratamento com a enzima DNase I a fim de remover os fragmentos de DNA genômico.

Comparativamente, o Protocolo 03 (RNeasy Mini-kit – Qiagen) foi o único procedimento que conseguiu aliar a integridade e qualidade do RNA extraído à repetibilidade da técnica de extração empregada, permitindo a utilização destas amostras em métodos subsequentes de análise que envolvem, por exemplo, digestão enzimática, amplificação e sequenciamento.

O uso de kits de extração baseia-se na adsorção do RNA. Estes usam a propriedade desse ácido nucleico de se ligar em superfícies como esferas magnéticas, sílica, materiais de látex de poliestireno, matriz de celulose ou fibras de vidro, na presença de determinados sais ou agentes antrópicos que possuem a propriedade de desorganizar a estrutura tridimensional de ácidos nucleicos e proteínas, ao desnaturar essas macromoléculas, o que permite alto rendimento a partir de pequenas quantidades de tecido biológico.

Amostras de RNA com estas qualidades, tão desejáveis, são possíveis devido ao uso da coluna que acelera, facilita, garante o lucro da extração e reduz o risco de contaminação durante o processo (FANSON; OSMACK; BISCEGLIE, 2000; SIDDAPPA et al., 2007). Em conjunto com o emprego da solução estabilizadora RNAlater® que permeia rapidamente a maioria dos tecidos de maneira a estabilizar e proteger o RNA e retardar o seu processo de degradação, sendo essencial no processo de extração, e da adição do tratamento enzimático com a DNase I, que permite, como observado na imagem do gel de agarose (FIGURA 6), a completa remoção dos fragmentos de DNA.

Em contra partida, o uso dos kits de coluna para extração de RNA apresenta por principal desvantagem o alto preço, além de não ser uma técnica adequada para a extração de pequenos RNAs, alguns pesquisadores descrevem, ainda, que pode resultar na extração de RNA menos puro se comparado à extração orgânica (FANSON; OSMACK; BISCEGLIE, 2000; SIDDAPPA et al., 2007).

Consonante, entende-se que não existe um protocolo de extração de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que possa ser considerado padrão, pois, a presença de polissacarídeos, polifenóis e uma grande gama de metabólitos secundários tornam difícil a padronização entre os diferentes tecidos e a obtenção de RNA de alta qualidade (CAMPOS et al., 2010; CARDILLO; GIULIETTI; MARCONI, 2006), tendo todo protocolo vantagens e desvantagens que devem ser criteriosamente analisadas após o emprego de testes direcionados ao material em estudo. Cada tecido biológico ou espécie de organismo apresenta

características intrínsecas a sua composição química e estrutural que podem interferir no sucesso das diferentes etapas do processo de extração. Ao mesmo tempo, cada reagente utilizado tem sua especificidade e importância neste processo, de maneira a contribuir com o isolamento, purificação e/ou integridade da molécula de RNA, o que torna possível e importante o teste e a manipulação dos diferentes protocolos disponíveis para a extração, quando se inicia um estudo molecular com uma espécie, como é o caso do *T. peregrinus*.

#### 4 CONCLUSÃO

O Kit comercial “RNeasy Mini-kit” (Qiagen) foi o método mais eficiente para extração de RNA total de *Thaumastocoris peregrinus*. No entanto, o protocolo de extração com o reagente D-Sorbitol (Sigma) apresentou também resultados satisfatórios e pode substituir de fato o Kit, desde que sejam realizados novos testes que permitam um maior rendimento no processo de extração com esse reagente. A extração com o uso de Tris reagente não é recomendada devido à sua baixa eficácia.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAS, S.; DURAN, A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD Analysis From Dry AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R.M. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, n. 4, p. 333-338, 2003.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **PCR Protocols**. Spftcover, 2003, p. 556.
- BITENCOURT, G. A.; CHIARI, L.; VALE, C. B. do.; LAURA, V. A.; MOURO, J. R. **Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2011. 22 p.
- CAMPOS, N. A.; ALVES, J. D.; PORTO, B. N.; SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. O.; SILVEIRA, H. R. O; MAGALHÃES, M. M. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p.97-104.
- CARDILLO, A. B.; GIULIETTI, A. M.; MARCONI, P. L. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae). **Electronic Journal of Biotechnology**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 196-198, 2006.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), **Zootaxa**, Auckland, v. 1228, n.1, p. 61-68, 2006.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113- 116, 1993.
- CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S.; **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Embrapa Gado de Corte, Circular Técnica 36, 1a edição, 2009.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- DENG, M. Y.; WANG, H.; WARD, G.B.; BECKHAM, T. R.; MCKENNA, T. S. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. **J Vet Diagn Invest**, v. 17, n. 6, p. 574-578, 2005.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- FANSON, B. G.; OSMACK, P. D. I.; BISCEGLIE, A. M. A comparison between the phenolchloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. **Journal of Virological Methods**, v. 89, n. 1-2, p. 23-27, 2000.

GOUVEIA, J. J. S.; REGITANO, L. C. A. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicados à Produção Animal**. São Carlos: Embrapa, 2007, p. 22-30.

IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. de A.; NICIMURA, S. C. M. Extração de RNA. In: REGITANO, L. C. de A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. de S. **Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. p. 9-13.

JAAKOLA, L.; PIRTTILA, A.M.; HALONEN, M.; HOHTOLA, A. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**, Washington, v.19, n.2, p.201- 203, 2001.

JACOBS, D. H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees: research in action. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

Leaf Material of Some Hesperis L. Specimens. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 461–461, 2003.

MARTINS, J. C.; SILVA JR, N. J.; ALMEIDA, P. C. R.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; SADDI, V. A. Padronização e Comparação de Métodos Aplicados à Extração de RNA Total em Serpentes do Gênero *Micrurus*. **EVS**, v. 45, p. 87-96, 2018.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, n.2, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL., D. W. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.

SIDDAPPA, N. B.; AVINASH, A. VENKATRAMANAN, M. RANGA, U. Regeneration of comercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. **BioTechniques**, v. 42, n. 2, p. 186-192, 2007.

WALDSCHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **R. Bras. Genet.**, v. 20, n. 3, p. 421-423, 1997.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; NOGUEIRA, DE SÁ, L. A.; BARBOSA, L. R.; DIAS, T. K. R.; FERREIRA-FILHO, P. J.; OLIVEIRA, R. J. R. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201-205, 2010.

### CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO GÊNICA EM GLÂNDULA E INTESTINO DE

*Thaumastocoris peregrinus*

#### RESUMO

O eucalipto hoje é considerado uma das espécies utilizada em plantios mais importantes economicamente para o Brasil, que se destaca como o país com maior área plantada, porém sua produção tem sofrido um declive, uma redução, devido ao estresse causado por doenças e pragas. O *Thaumastocoris peregrinus* (percevejo bronzeado), é uma nova praga exótica, que causa grandes danos às plantações, e poucos são os estudos relacionados ao seu controle. Até o momento não foi descoberto um controle eficaz para essa praga, porém o avanço nas pesquisas moleculares tem auxiliado com informações que vão subsidiar trabalhos de melhoramento genético de plantas. Dentre as técnicas existentes, um método que tem ganhado destaque nas pesquisas é a transcrição Reversa em Tempo Real RT-qPCR que tem como finalidade avaliar a expressão gênica diferencial através da fluorescência em um termociclador. A RT-qPCR através dos genes de interesse pré-selecionados é capaz de subsidiar estratégias de melhoramento genético em plantas que são atacadas por pragas, dando-lhe informações para transformação genética e proporcionando resistência às plantas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a expressão gênica diferencial de glândulas salivares e intestino do percevejo bronzeado, sendo os insetos alimentados com genótipos de eucalipto resistente e susceptível ao seu ataque com a finalidade de avaliar os genes que estão sendo expressivos e/ou reprimidos, em resposta à alimentação. Observou-se que alguns dos genes de interesse demonstraram alterações de acordo com o tratamento submetido e que alguns desses genes são responsáveis por dá resistência ao inseto, por meio da desintoxicação do seu organismo, em resposta às substâncias de defesa que a planta libera ao ser atacada.

**Palavras-chave:** Praga. RNA. Eucalipto.

## ABSTRACT

Today eucalyptus is considered one of the species used in the most economically important plantations for Brazil, which stands out as the country with the largest planted area, but its production has suffered a slope, a reduction, due to the stress caused by diseases and pests. *Thaumastocoris peregrinus* (tan bug) is a new exotic pest that causes great damage to plantations, and there are few studies related to its control. So far, an effective control for this pest has not been discovered, but the advancement in molecular research has helped with information that will subsidize works of genetic improvement of plants. Among the existing techniques, a method that has gained prominence in research is the RT-qPCR Reverse Real-Time transcription that aims to evaluate differential gene expression through flowering in a thermocycler. RT-qPCR through pre-selected genes of interest is able to support genetic improvement strategies in plants that are attacked by pests, providing information for genetic transformation and providing resistance to plants. Thus, the present study aimed to evaluate the differential gene expression of salivary glands and the gut of the tan bug, with insects fed with resistant eucalyptus genotypes susceptible to their attack in order to evaluate the genes that are being expressive and / or repressed, in response to food. It was observed that some of the genes of interest showed changes according to the treatment submitted and that some of these genes are responsible for giving resistance to the insect, through the detoxification of its organism, in response to the defense substances that the plant releases when being attacked.

**Key words: Pest. RNA. Eucalyptus.**



## 1 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais têm se tornado corriqueiros em todo o mundo, sendo indispensáveis maiores investimentos em pesquisas que busquem contorná-los e auxiliar no processo de melhoramento das espécies comerciais, que sejam capazes de suportar as adversas condições ambientais. Tendo em vista o desafio e a necessidade de produzir mais, em um curto período de tempo, devido ao grande crescimento populacional, se faz necessário o aprimoramento de técnicas de melhoramento para conferir maior produtividade e precocidade às culturas agrícolas e florestais (MORGANTE, BLAWID, 2016).

Com o avanço nas pesquisas, vem sendo conduzidos estudos com a finalidade de induzir resistência às plantas tanto aos danos causados pelos herbicidas quanto a doenças e pragas e, neste sentido, métodos biotecnológicos vêm sendo empregados. Dentre eles, têm-se as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR) que são fundamentais para o conhecimento das culturas agrícola, florestais e o mapeamento das características desejáveis das plantas para utilização nos programas de melhoramento genético (MORGANTE, BLAWID, 2016).

A RT-qPCR é uma técnica da biologia molecular que tem dentre as finalidades, a detecção de ácidos nucleicos alvo de um modo acelerado, específico e sensível. Inicialmente para realizar a expressão gênica é necessário o isolamento do RNA da amostra que será estudada. Em seguida, é obtido o cDNA (DNA complementar), que por fim é utilizado para a RT-qPCR, de onde são geradas curvas de amplificações que irão auxiliar na determinação do Ct (*Cycle Threshold*), o ponto no qual a fluorescência atinge um nível limite, utilizado para quantificar o cDNA e determinar a expressão gênica (GINZINGER, 2002; WONG; MEDRANO, 2005; VALASEK; REPA, 2005; RODRIGUES, 2015).

Existem inúmeras aplicações para a técnica de RT-qPCR. Alguns autores destacam que a análise da expressão gênica aumenta o entendimento da sinalização das vias metabólicas englobadas em vários processos biológicos, entre eles as interações com fatores ambientais. Nesse contexto, a RT-qPCR é o método mais eficaz para obtenção do perfil de expressão gênica de um determinado organismo (EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al.; 2008; RODRIGUES, 20015).

Para realização da RT-qPCR é importante a escolha dos genes de referência, pois são eles que irão validar seus resultados. Esses genes são referências que apresentam expressão uniforme em uma determinada amostra e não variam com as condições ambientais (JAIN et al., 2006; EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008; RODRIGUES, 2015). Neste

contexto, são encontrados estudos na literatura objetivando escolher os genes de referências mais adequados para cada organismo.

Alguns mecanismos de adaptação às condições ambientais são observados no padrão de expressão gênica, essas respostas adaptativas englobam inúmeras informações genéticas que controlam as mudanças metabólicas. Sendo assim, a quantificação da expressão gênica é bastante útil para demonstrar a resposta do estresse fisiológico de um determinado organismo (DESROCHE; BELTRAMO; GUZZO, 2005; FERNANDES, 2014)

Alguns autores utilizaram a técnica da RT-qPCR com o objetivo de detectar a expressão gênica em insetos (BROADWAY; DUFFEY, 1986; BOLTER; JONGSMA, 1997; RANSON et al., 2002; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; DESPRES; DAVID; GALLET, 2007; JONES et al., 2010; PUINEAN et al., 2010; PARDE; SHARMA; KACHOLE, 2010; SOUZA, 2011; YAN et al., 2012; FERNANDES, 2014), e ressaltam que insetos podem desenvolver resistência tanto à inseticida quanto a compostos químicos que as plantas liberam, transformando os compostos tóxicos em produtos químicos menos tóxicos ou não tóxicos. A tolerância e/ou resistência do inseto aos compostos tóxicos existentes na seiva pode ser decorrente da super-expressão de enzimas de desintoxicação, como monooxigenases do citocromo P450 (P450), UDP-glucuronosiltransferase (UGT) e glutathione-S-transferase (GST) (RANSON et al., 2002; JONES et al., 2010; PUINEAN et al., 2010; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; DESPRES; DAVID; GALLET, 2007), que ocorrem no intestino do inseto.

O gene GAPDH é considerado um dos genes endógenos mais analisados em estudos relacionados à super-expressão de enzimas de desintoxicação; está ligado às vias metabólicas da glicólise e no processo celular de reparo do DNA, exportação de RNA, fusão de membrana e transporte, dinâmica do citoesqueleto e a morte celular (HARA, et al., 2005; TRISTAN et al., 2011; SOUZA, 2011).

Outros genes estudados estão envolvidos na síntese da Actina, composto que está presente em todas as células eucarióticas onde é conservada em níveis nucleicos e em sequências de aminoácido (FYRBERG; KINDLE; DAVIDSON, 1980; ZAFAR; SODJA, 1983; MOUNIER et al., 1987; HADDEN; SODJA, 1994; SOUZA, 2011). Em insetos do filo artrópodes, estes genes podem estar envolvidos no metabolismo do citoesqueleto e músculos (SALAZAR et al., 1994; SOUZA, 2011). Em adição, o gene envolvido na síntese da Tripsina, considerada a principal enzima responsável pela digestão de alimento, encontrada no intestino de diversos animais (SOUZA, 2011).

No contexto de resposta das plantas em defesa ao ataque de percevejo bronzeado, (*Thaumastocoris peregrinus*), este trabalho objetivou quantificar a expressão gênica diferencial de genes expressos e responsivos nas glândulas salivares e no intestino do inseto, durante a alimentação de *Eucalyptus* sp resistentes e suscetíveis, e insetos ficando em jejum.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), situado no Departamento de Engenharia Florestal e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizados no Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde (CIPq-Saúde), ambos situados na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Diamantina, MG.

### **2.1 Extração de RNA Total**

O RNA total dos insetos foi extraído utilizando-se os reagentes do RNeasy Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante, e descritas no capítulo 2 deste trabalho.

### **2.2 Genes de interesse e endógenos**

Com base nos estudos prévios realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF) quando da construção das Bibliotecas Subtrativas Supressivas (SSH) para esses mesmos materiais genéticos e com base na literatura, 17 genes envolvidos nas vias metabólicas do inseto em resposta a defesa das plantas foram escolhidos para estudo, sendo 10 de interesse e 7 endógenos. As sequências de nucleotídeos desses 10 genes foram recuperadas a partir do GenBank (BENSON et al., 2015; RODRIGUES, 2015) e constam na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers Utilizados na Transcrição Reversa em Tempo Real – RT-qPCR

<b>Genes de interesse</b>			
<b>Nome dos genes</b>	<b>Sigla</b>	<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>
alpha-amylase	a-amy	AAGGAACGGATGTGAACCAC	TTCTGCTCAGCGTTGATAGC
Trypsin	Try-1	AACTCGAAGGCAAACAGGTC	AACATTACCGGGCAATTGCG
aldose 1-epimerase	Ald-1	ACTGTGAGGATGCCAGACAAG	TCCCTATCATTGCTCCGAAC
Chymotrypsin	ChyT-1	TATGGTCCGGATGGAAAGAC	CGATTTTGTGCAGTGTGCTG
Glucosidase	Glu-1	TTGCTGTGATGGGTCTGATG	GCCTCAGCCATCATTGTTC
Glycogen phosphorylase	Gly	CGGAATGAGAGTGCATGAAG	CATCCCGTATCATGTTCGATG
Glutathione-S-transferases	GST	AGGAAAGCAAGCCAAGTTGG	GCCCATGCTTTTTGGACTTG
Glutathionetransferases	GT	GCAATGGCCAAACATCAAGC	TCTTTCCCAACAAGCTTGGC
polygalacturonase	Poly-1	GGAAGGACCACTCATCCTCA	ACCGTCAACGGAAGAATCAG
UDP-glucuronosyltransferase	U-Glu	TGTACCGAAGGCCCAAATAC	GACAACAGCTCTCGCAAACA
<b>Genes de endógenos</b>			
<b>Nome dos genes</b>	<b>Sigla</b>	<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>
60S ribosomal protein	L26	AGGTGGACAAAGATCGCAAG	AAGTGTCCATTGCTGTCGTG
Metabolism	G6PDH	AGCCTGGAGAAGCGGTTTACGTTA	GTGAGCCACAGAATACGTCGAGT
b-actin	ACT	AATCAAGATCATTGCTCCACCAG	TTAGAAGCATTGCGGTGGAC
Glyceral dehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	GATGGCGCCCAGTACATAGT	AGCTGACGGGGCTGTTATTA
18S ribosomal RNA	18S	TCCTTCGTGCTAGGAATTGG	GTACAAAGGGCAGGGACGTA
Ionotropic receptor co-receptor	Rprolr76b	GCGTTTGCGTACCAAATGGACA	GCGTCCGGTAGATCCAAAGTGATT
Structural subunit of microtubules	TUB	TTTCCTCGATCACTGCTTCC	CGGAAATAACTGGGGCATAA

Fonte. Autor, 2020.

### 2.3 Quantificação relativa dos genes de resposta imune

Os genes endógenos (Tabela 1) foram utilizados como controles com a finalidade de normalizar as reações. Nesse sentido, os valores dos níveis de expressão relativa dos genes de resposta foram calculados pelo método de Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) comparativo.

### 2.4 Análise da Transcrição Reversa em Tempo Real – RT-qPCR

As reações foram realizadas utilizando o equipamento *StepOne TM Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. O experimento foi composto por 3 replicatas biológicas, ou seja, extração do RNA de 3 conjuntos de 5 insetos que foram alimentados de plantas suscetível, resistente e em jejum, as quais contaram com duas réplicas técnicas. Para a realização das reações da RT-qPCR foram utilizados os reagentes *EXPRESS-Once STEP SYBR GreenER Kit, with premixed ROX (Invitrogen)*, conjunto de reagentes que tem um ponto importantíssimo na economia de tempo nas confecções das reações, pois a junção dos reagentes produz o cDNA e ao mesmo tempo quantifica o transcrito em uma única reação. A reação final com 10 µL foi submetida ao protocolo descrito pelo fabricante e na quantidade apresentada na Tabela 2. Os resultados foram analisados por meio do *software Step-One Plus versão 2.3 (Applied Biosystems)*.

Tabela 2 - Componentes utilizados na transcrição reversa em tempo real – RT-qPCR

Reagentes	Quantidade (µL)
<i>Super rox</i>	5,0
Iniciador R	1,0
Iniciador F	1,0
<i>Super mix</i>	0,25
RNA	1,0
H <sub>2</sub> O	1,75
<b>Total</b>	10,0

Fonte. Autor, 2020.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

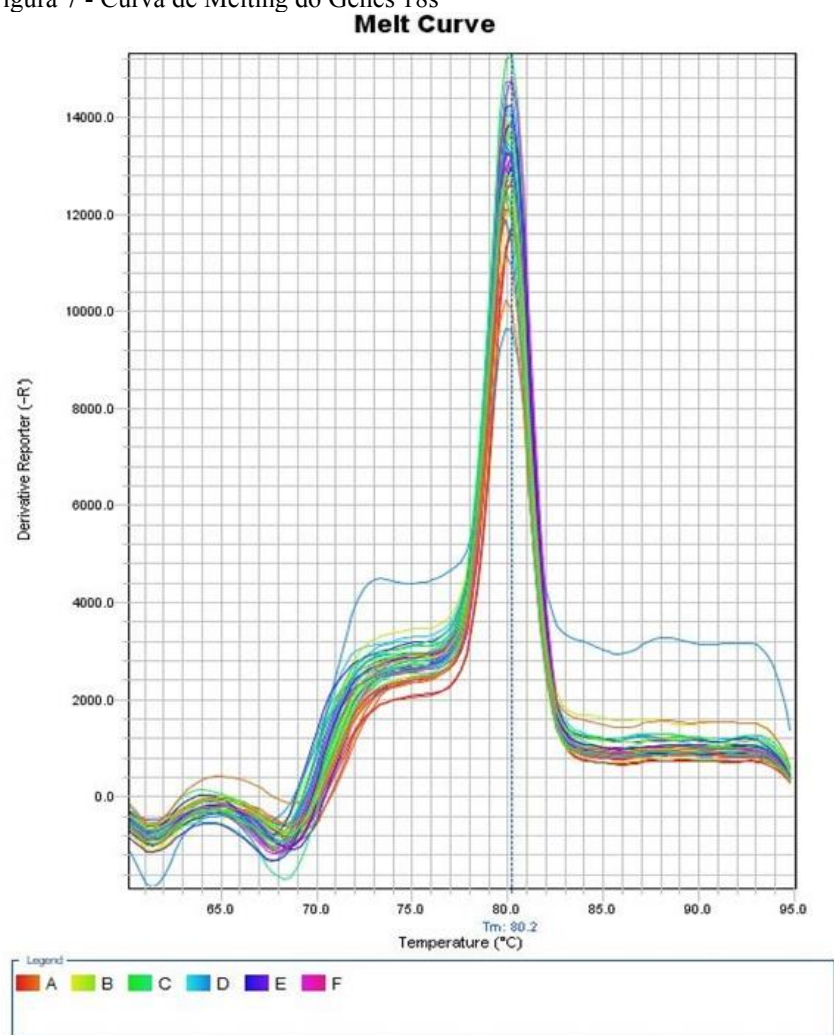
De acordo com os resultados observa-se, que para os genes G6PDH e 18s as curvas de dissociação ou Curvas de *Meltinging* mostram apenas um pico, indicando tratar-se de uma amplificação específica onde a curva de dissociação para cada tratamento e o padrão entre elas não diferiu. Salienta-se que algumas réplicas apresentaram pequenos picos sem ser o principal, que pode ser devido a formação de dímeros de primers, que sendo de pequenos tamanhos não interferem nos resultados do experimento (FERNANDES 2014).

Para cada gene foi gerado uma Curva de *Meltinging* (Figura 7 a 23)

Alguns autores (FERNANDES, 2014; RODRIGUES, 2015; MORGANTE, BLAWID, 2016) destacam a importância da avaliação da Curva de *Meltinging* para que se possam obter resultados concretos e confiáveis em um determinado experimento. É através dela que se confirma a especificidade do gene para a determinada amostra, além de ser possível observar possíveis contaminações que podem ocorrer em função do SYBRTM *Green*, que pode se ligar inespecificamente a qualquer molécula de DNA de fita dupla.

A Curva de *Meltinging* é realizada ao final de cada reação RT-qPCR automaticamente pelo termociclador e seu *software Step-One Plus versão 2.3 (Applied Biosystems)*. Para a construção dessa curva ao final da reação os *amplicons* são desnaturados a 94-95 °C, depois renaturados gradualmente até atingir a temperatura de 60 °C (MORGANTE, BLAWID, 2016). Algumas curvas precisam de ajustes na reação da RT-PCR (GAPDH, *amy*, *ChyT-1*, *Gst*, *Rprol76b*, *Try-1*, *Tub*, *U-glu*) sendo que desses, GAPDH, *Rprol76b*, *Tub*, são genes endógenos e o restante genes de interesse. Os ajustes podem ser, por exemplo, de concentrações mais específicas tanto do mRNA quanto dos Genes, ou que os genes escolhidos não sejam especificamente indicados para as amostras estudadas. Anormalidades observadas na curva remetem a possibilidade de problemas na RT-qPCR podendo afetar sua eficiência (MORGANTE E BLAWID, 2016). Muitas vezes, esses problemas são causados pela presença de contaminantes, amplificação inespecífica, formação de dímeros de primers, e a principal é o iniciador não específico para a determinada amostra.

Figura 7 - Curva de Melting do Genes 18s



Fonte. Autor, 2020.

Figura 8 - Curva de Melting do Genes a-amy

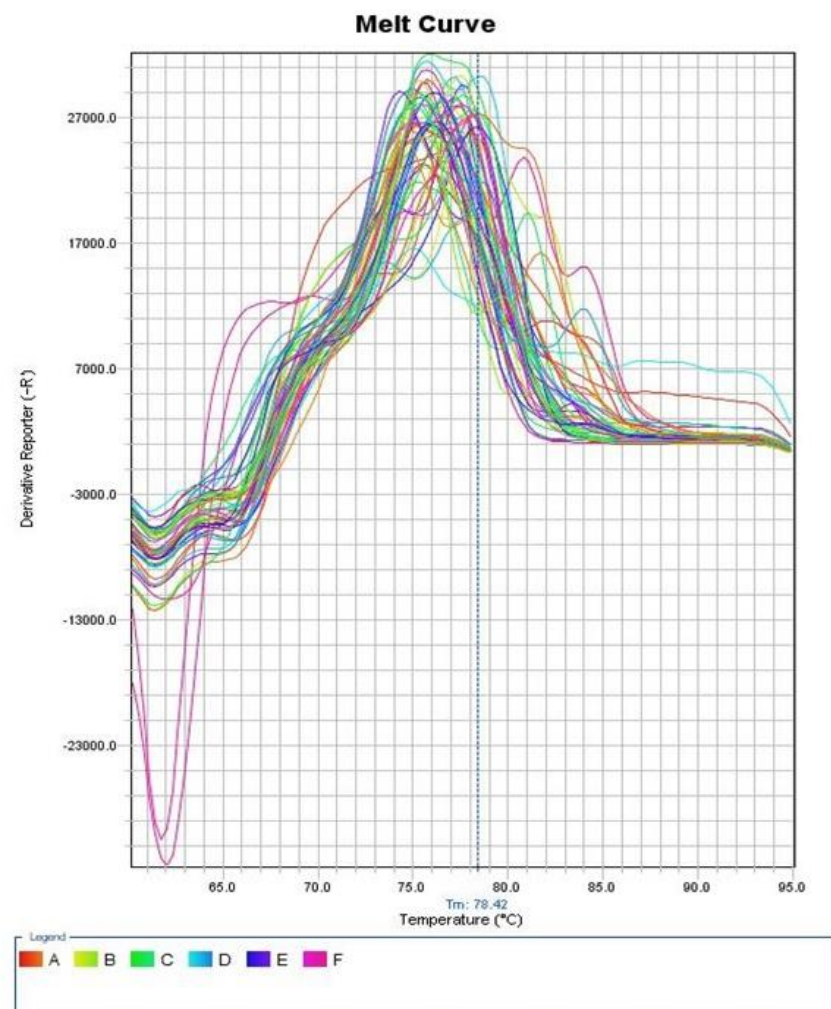
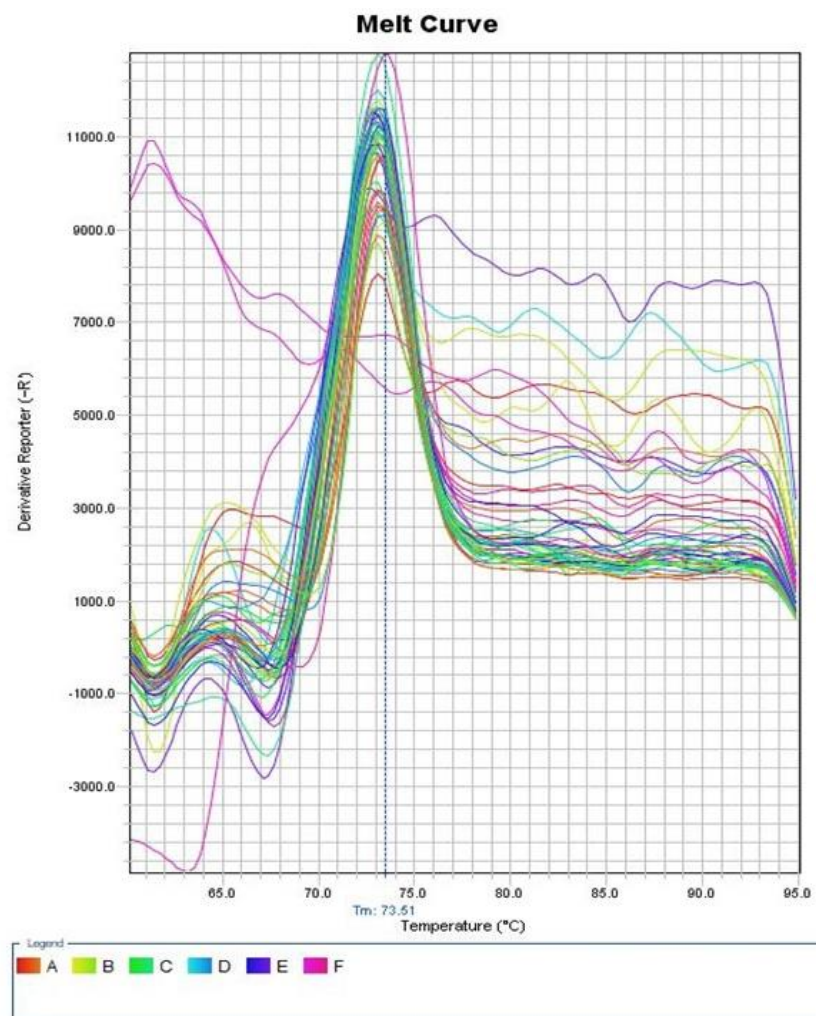




Figura 9 - Curva de Melting do Genes Act



Fonte. Autor, 2020.

Figura 10 - Curva de Melting do Genes ALD-1

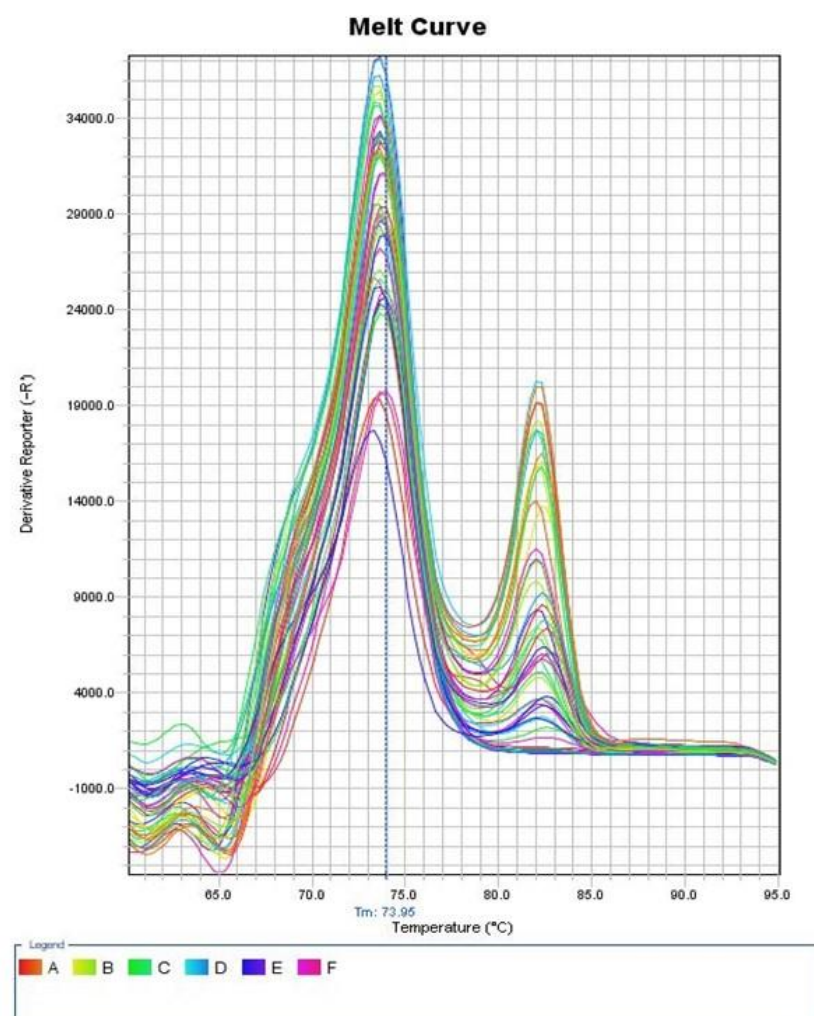
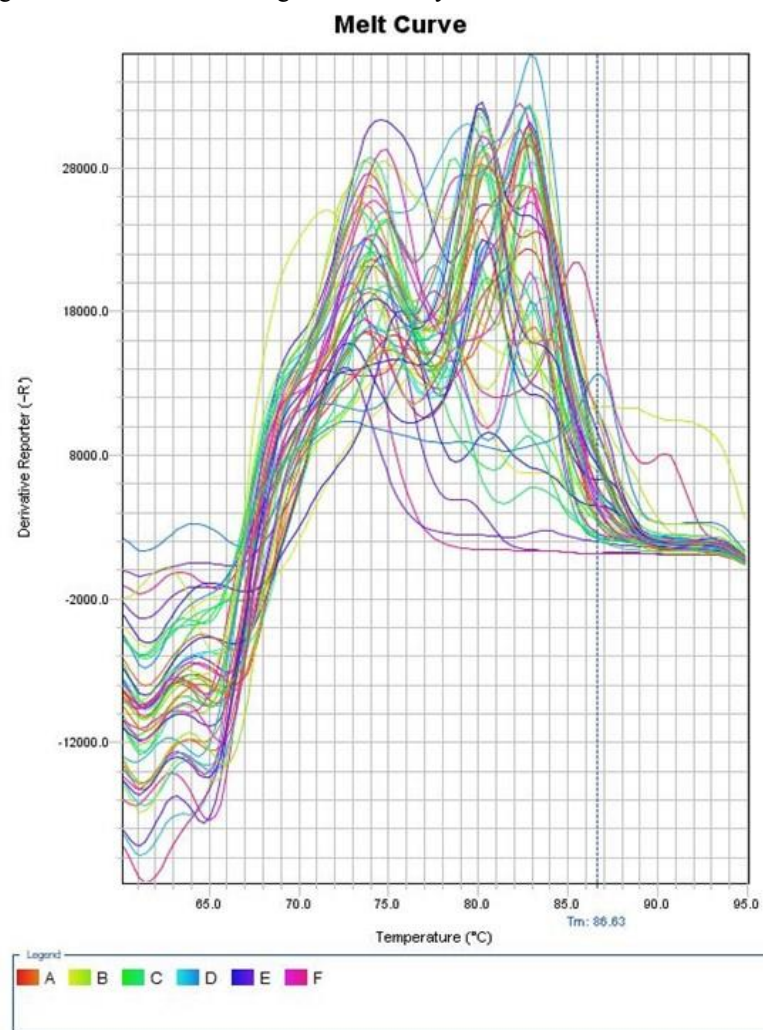


Figura 11 - Curva de Melting do Genes ChyT-1



Fonte. Autor, 2020.

Figura 12 - Curva de Melting do Genes G6PDH

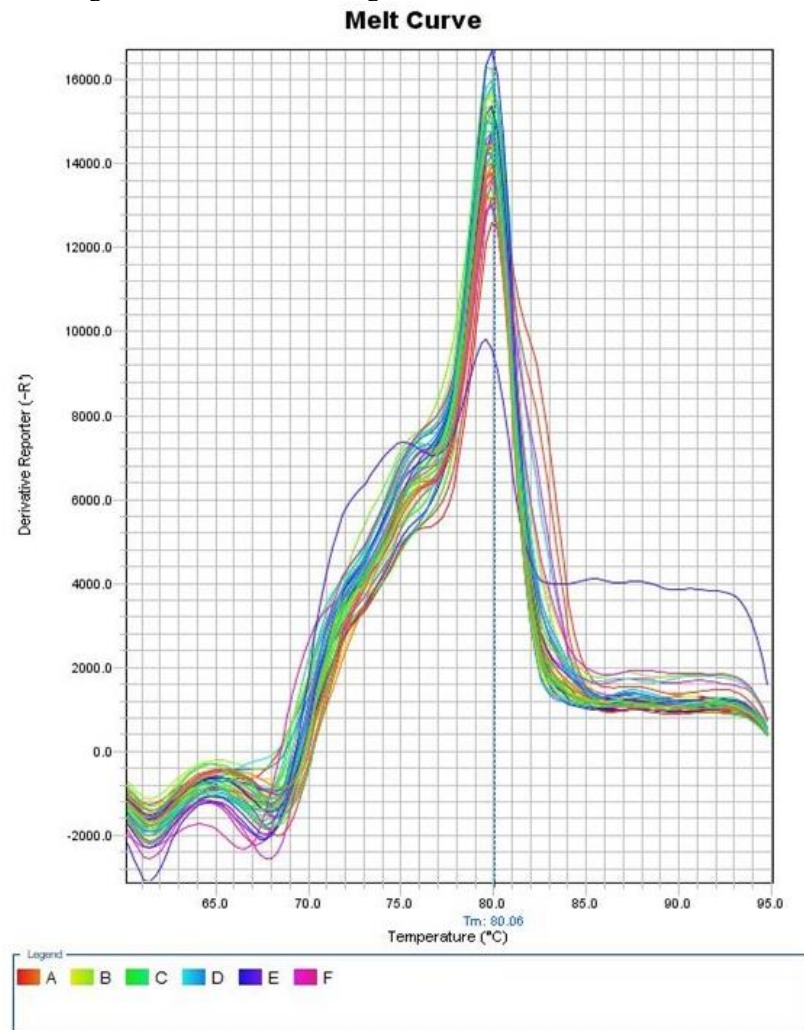
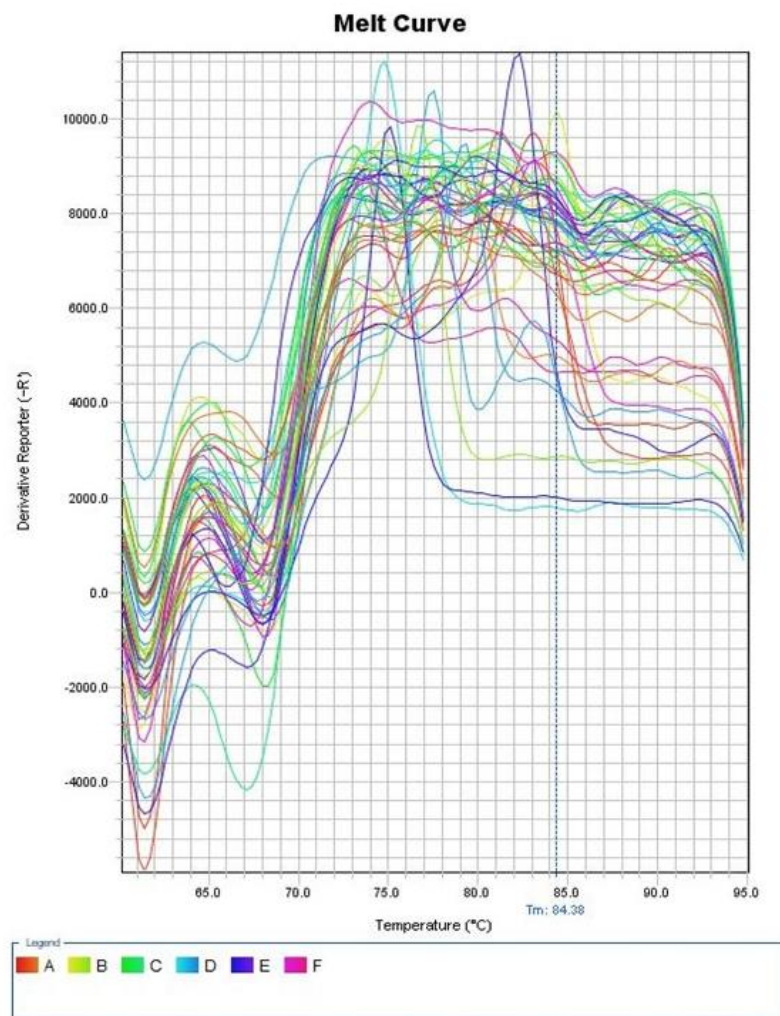


Figura 13 - Curva de Melting do Genes GAPDH



Fonte. Autor, 2020.

Figura 14 - Curva de Melting do Genes GLU-1

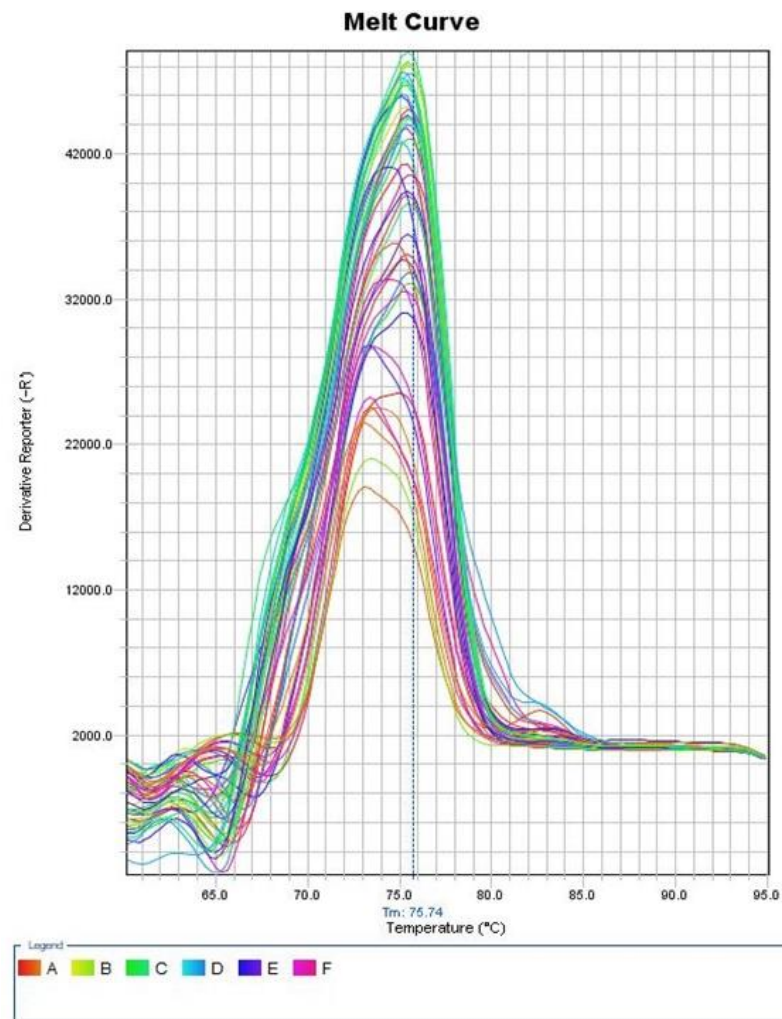
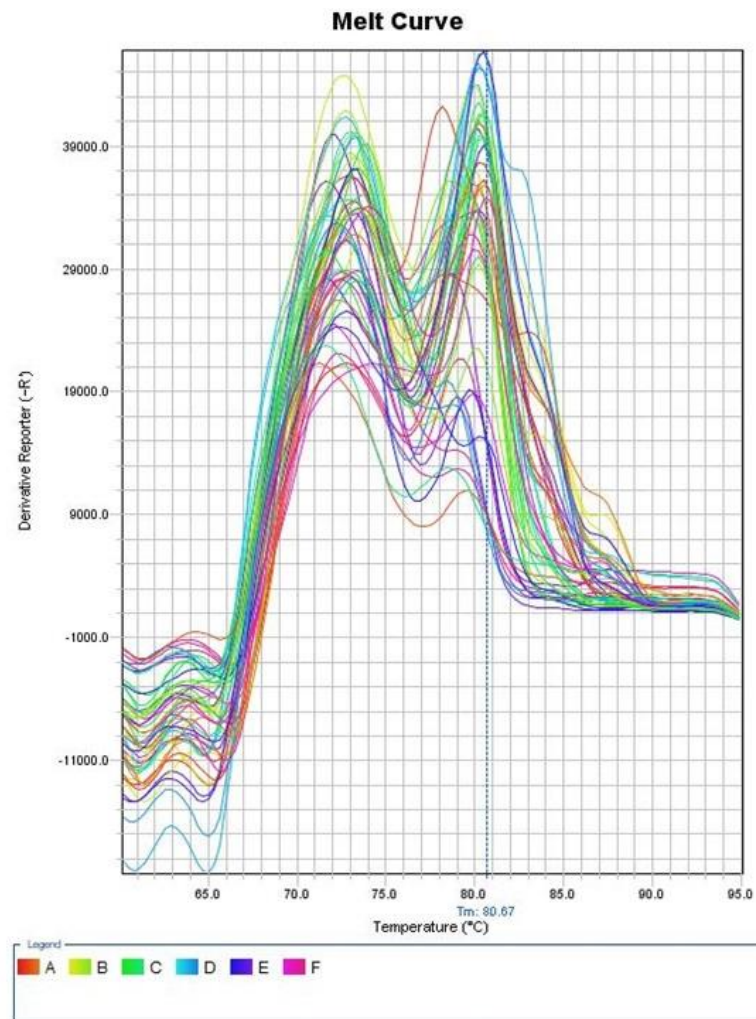




Figura 15 - Curva de Melting do Genes GLY



Fonte. Autor, 2020.

Figura 16 - Curva de Melting do Genes GST

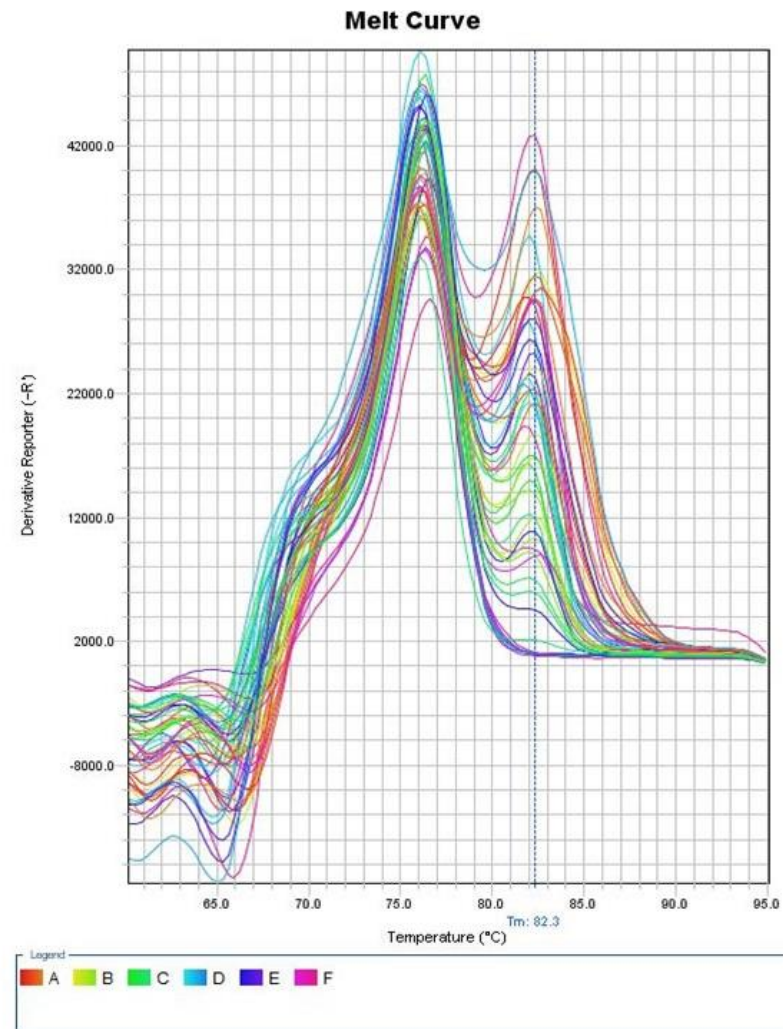
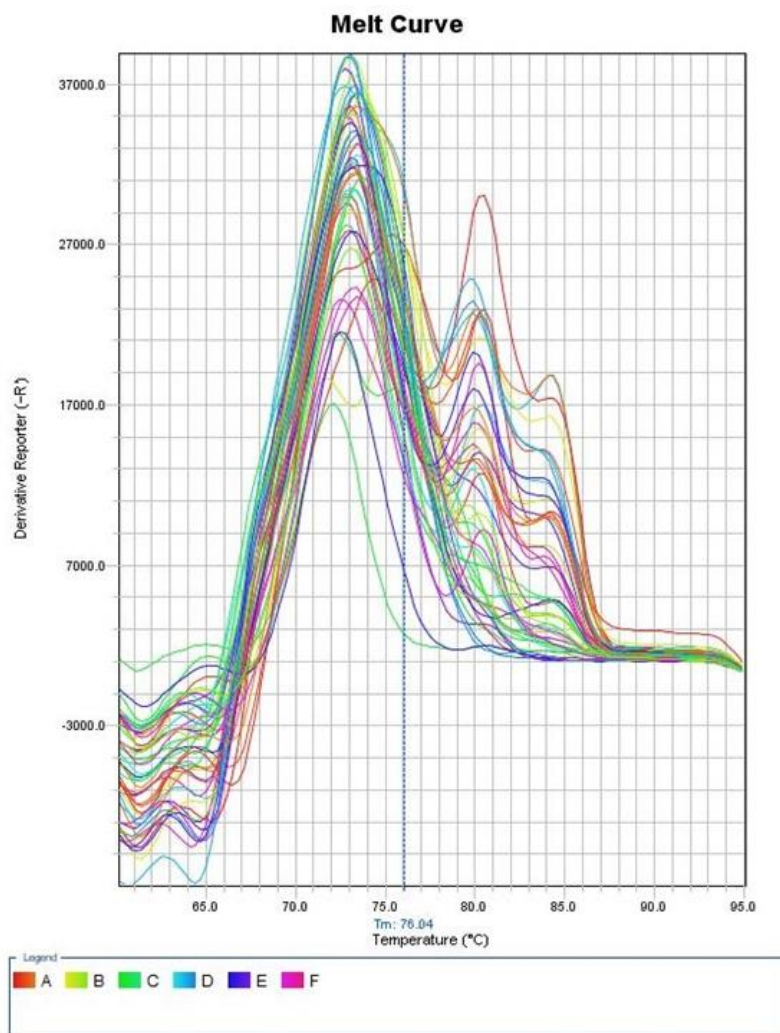


Figura 17 - Curva de Melting do Genes GT



Fonte. Autor, 2020.

Figura 18- Curva de Melting do Genes L26

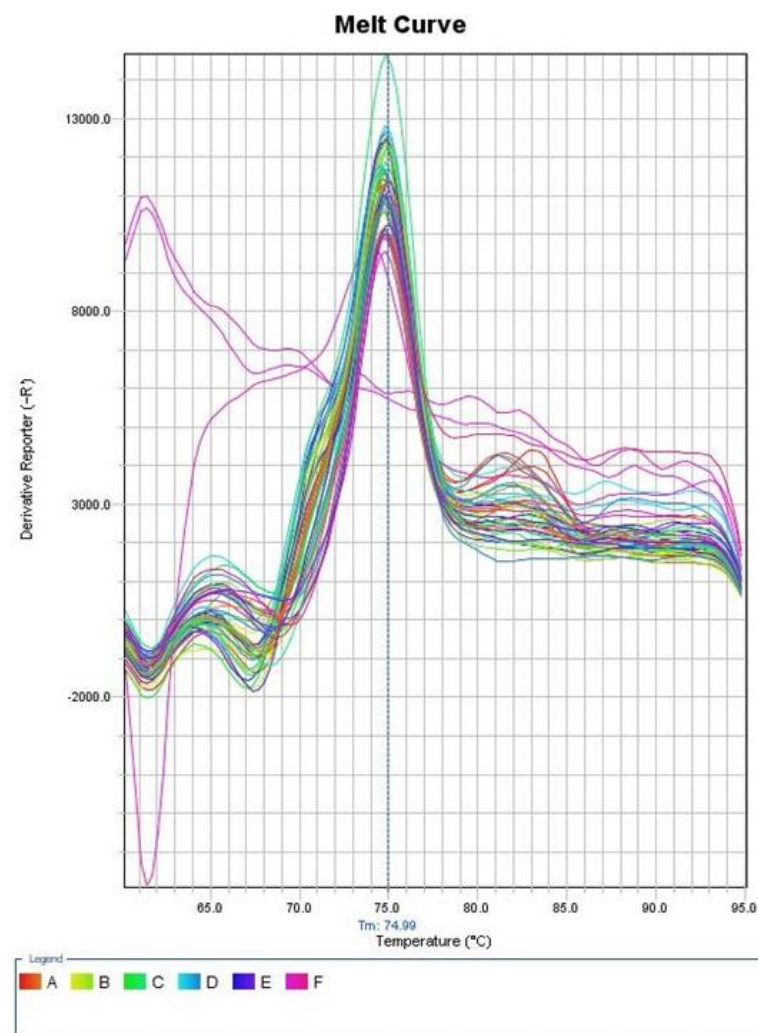
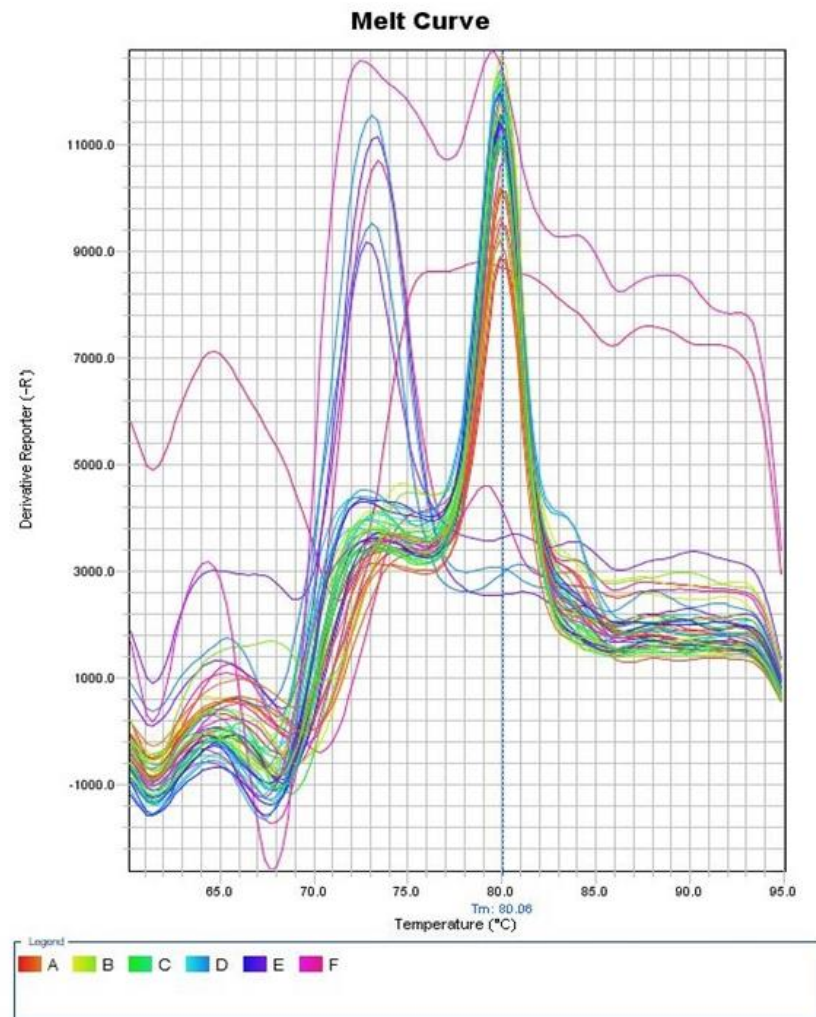


Figura 19 - Curva de Melting do Genes POLY-1



Fonte. Autor, 2020.

Figura 20 - Curva de Melting do Genes RprolR76b

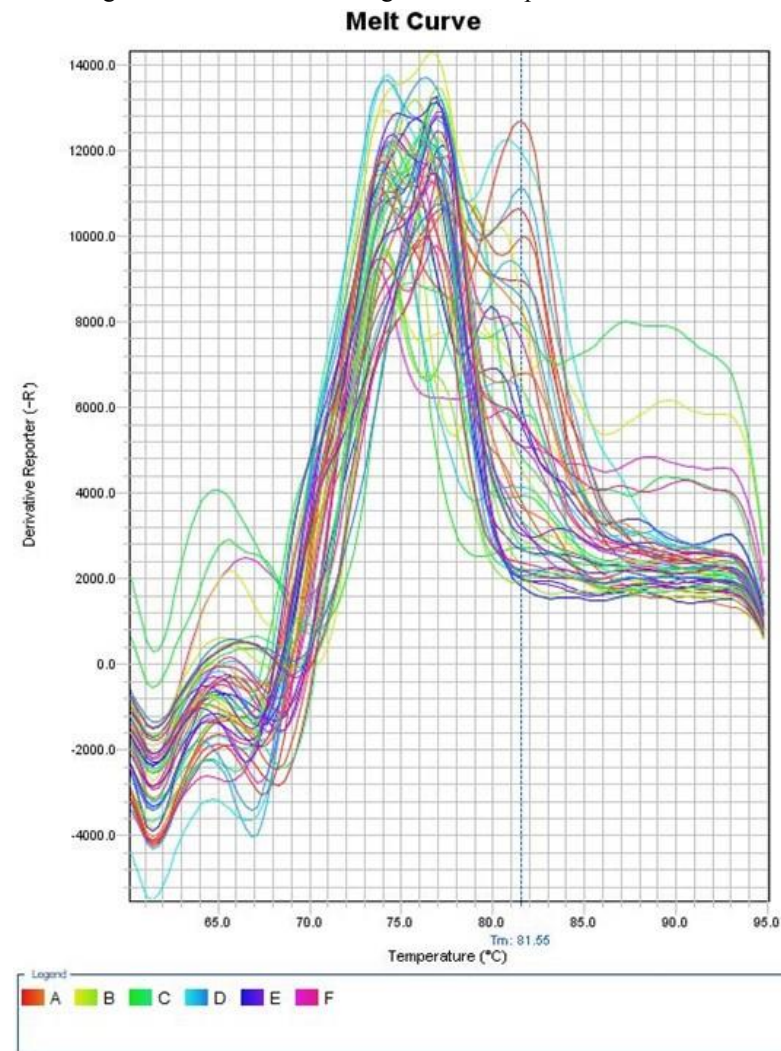




Figura 21 - Curva de Melting do Genes TRY-1

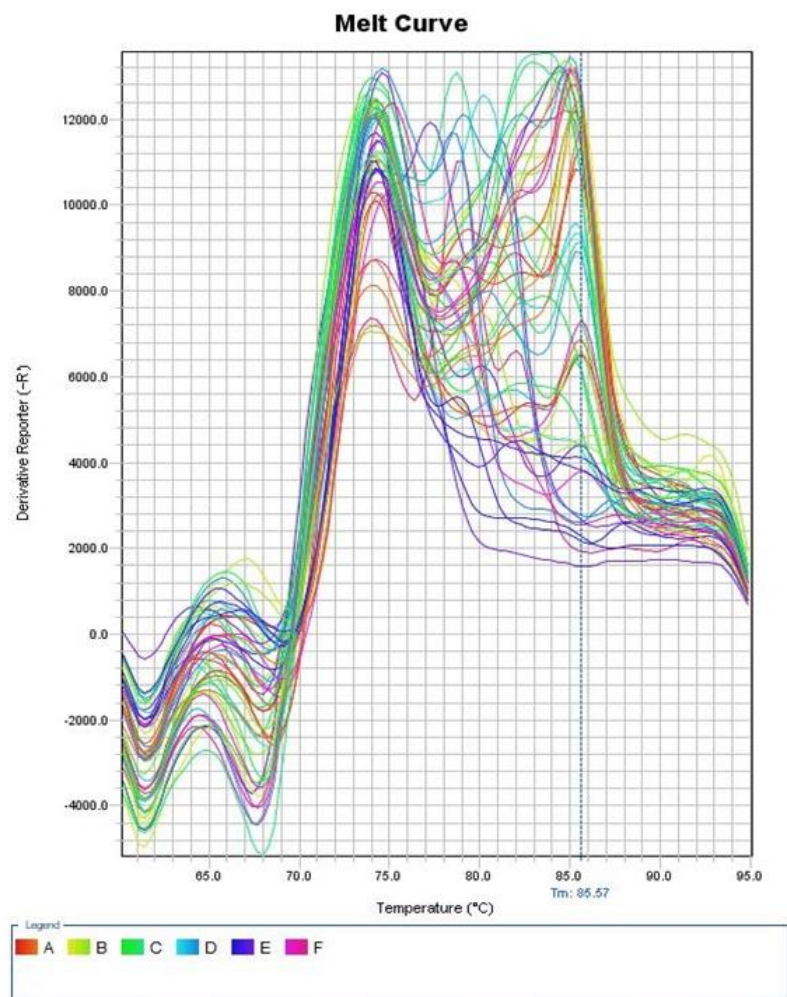
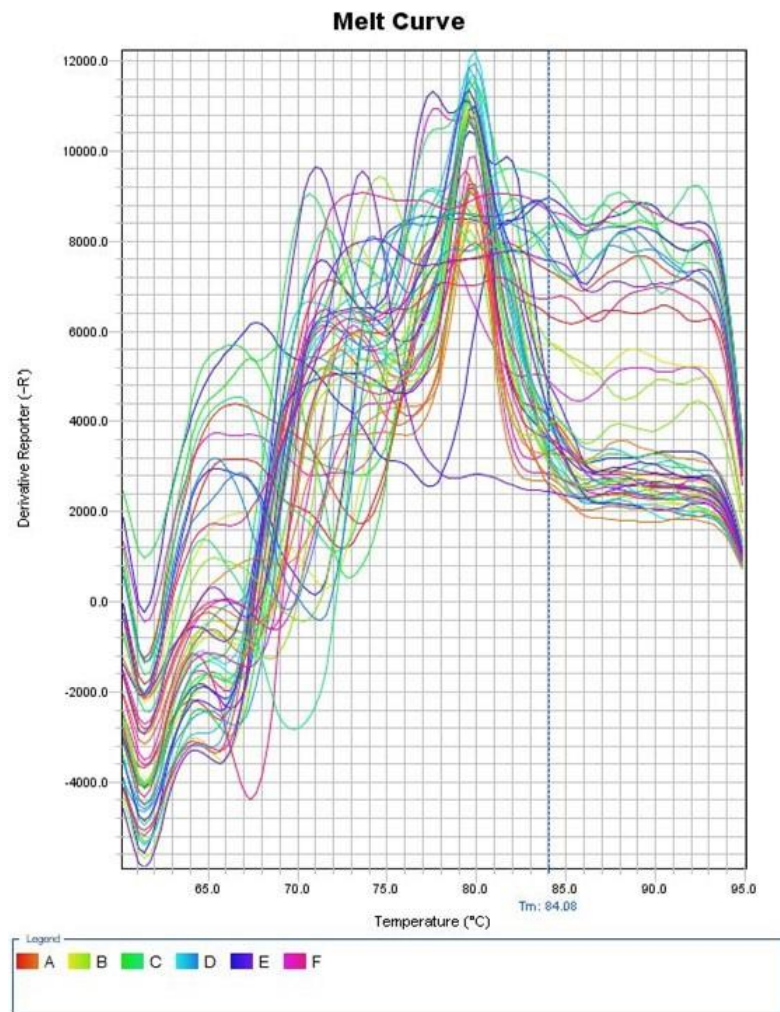
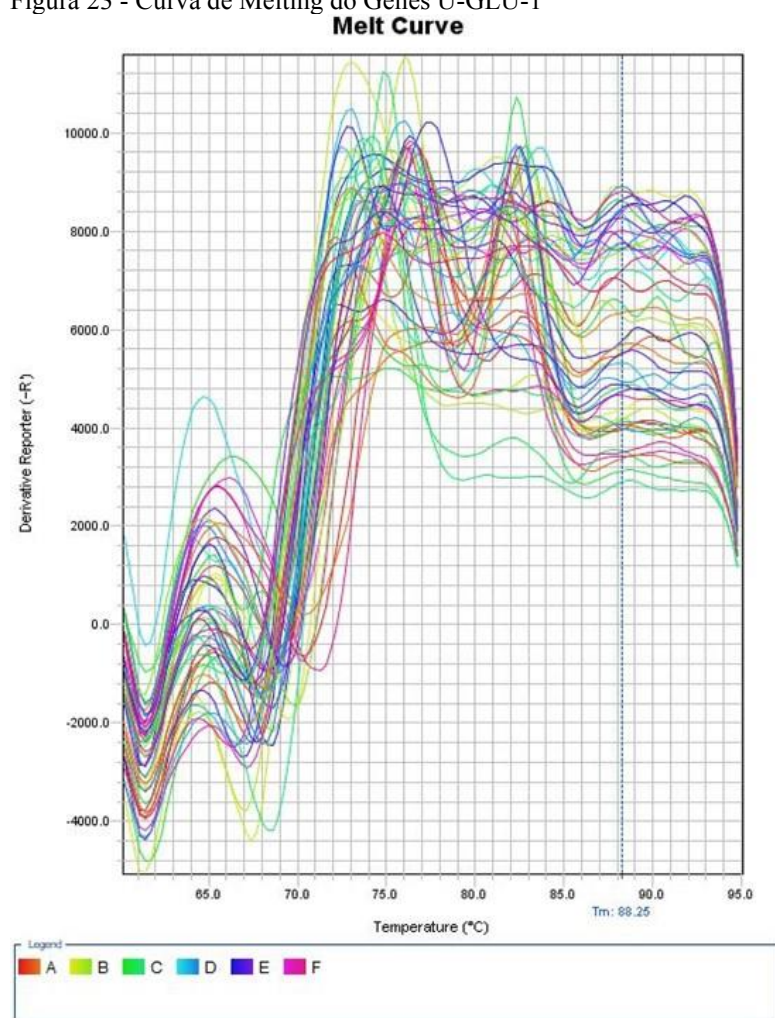


Figura 22 - Curva de Melting do Genes TUB



Fonte. Autor, 2020.

Figura 23 - Curva de Melting do Genes U-GLU-1



Fonte. Autor, 2020.



### 3.1 Identificação dos genes de referência mais estáveis

Para que se tenha confiabilidade dos resultados da análise da RT-qPCR é necessária a realização da análise de normalização com genes de referência, visto sua grande importância técnica para o resultado final. Sendo assim os genes de referência são utilizados como um sinal ativo para normalizar os resultados experimentais.

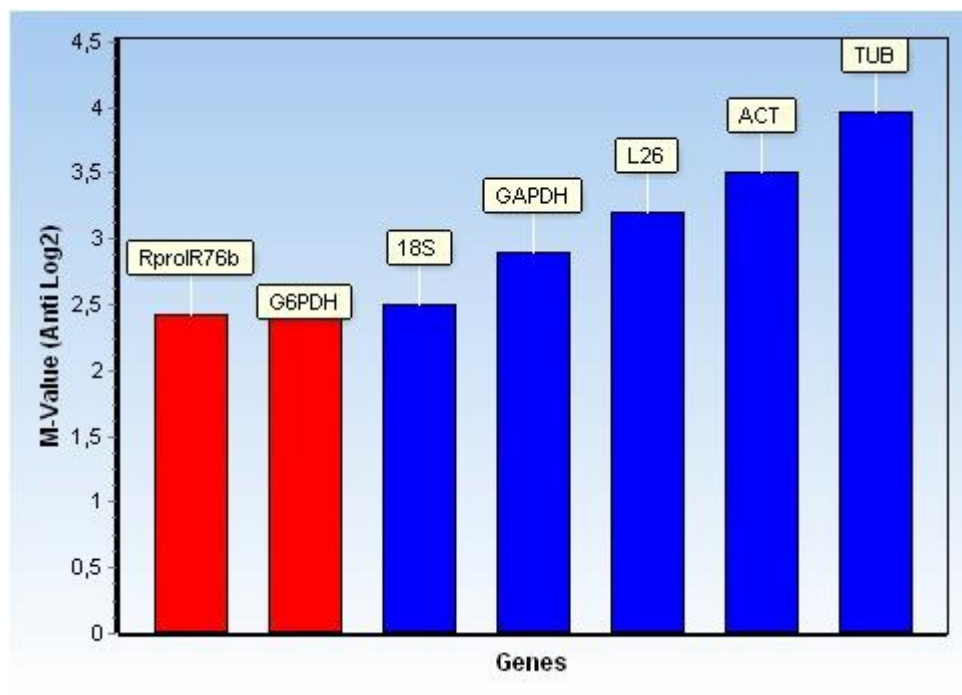
Para que se possa obter um resultado confiável é importante que se realize a normalização com dois ou três genes endógenos, não sendo indicada a utilização de apenas um, o que pode originar erros nos resultados finais (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008; GUÉNIN et al., 2009; RODRIGUES, 2015; MACÁRIO, 2016).

Nos resultados obtidos, observou-se que dois dos setes genes endógenos testados mostram maior estabilidade, são eles o G6PDH e RprolR76b (FIGURA 11 e 19), normalizadores para esse trabalho. Esses Genes são importantes para a análise da expressão gênica. A fim de aprimorar o resultado da RT-qPCR, existem inúmeros genes referência e normalmente são utilizados o GAPDH, 18S ribossomal, e vários outros (PAIM, et al., 2012; ZHENG; YE, 2014; MACÁRIO, 2016).

A análise de normalização realizada pela ferramenta computacional no programa *GenEX* quantificou a estabilidade dos genes de referências. Foi através dessa análise que determinou-se que os genes RprolR76b e G6PDH mostram-se estáveis, enquanto que os demais genes não foram expressos constantemente não sendo recomendada a sua utilização para normalização.

Nesse contexto é indispensável que se faça uma normalização adequada para que se possa obter um resultado confiável e uma ótima quantificação da expressão gênica (GUTIERREZ et al., 2008; GUÉNIN et al., 2009; RODRIGUES, 2015).

Figura 24 - Estabilidade da expressão gênica dos genes de referência, quanto mais baixo o valor de M mais estabilidade tem os genes.



Fonte. Autor, 2020.

Observa-se na Figura 25 a comparação relativa da expressão gênica que é representada por insetos em jejum (controle), insetos alimentando de clone de eucalipto resistente e suscetível. O gene (U-Glu-1), enzima *UDP-glucuronosyltransferase*, apresentou uma maior taxa de expressão nos insetos quando alimentados com clones de eucalipto suscetível. Já os genes Gt e Gst não tiveram diferença considerável entre os grupos. A resistência do inseto aos compostos tóxicos existentes na seiva pode ser decorrente da super-expressão de enzimas de UDP-glucuronosiltransferase (UGT) e glutathione-S-transferase (GST) (RANSON et al., 2002; JONES et al., 2010; PUINEAN et al., 2010; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; DESPRES; DAVID; GALLET, 2007), que ocorrem no intestino do inseto. Estas proteínas podem transformar inseticidas e compostos tóxicos em produtos químicos menos tóxicos ou não tóxicos (YAN et al., 2012). Portanto, as glândulas salivares e o intestino desempenham papel importantíssimo na sobrevivência dos insetos e são fundamentais na interação planta-inseto e resistência a compostos tóxicos.

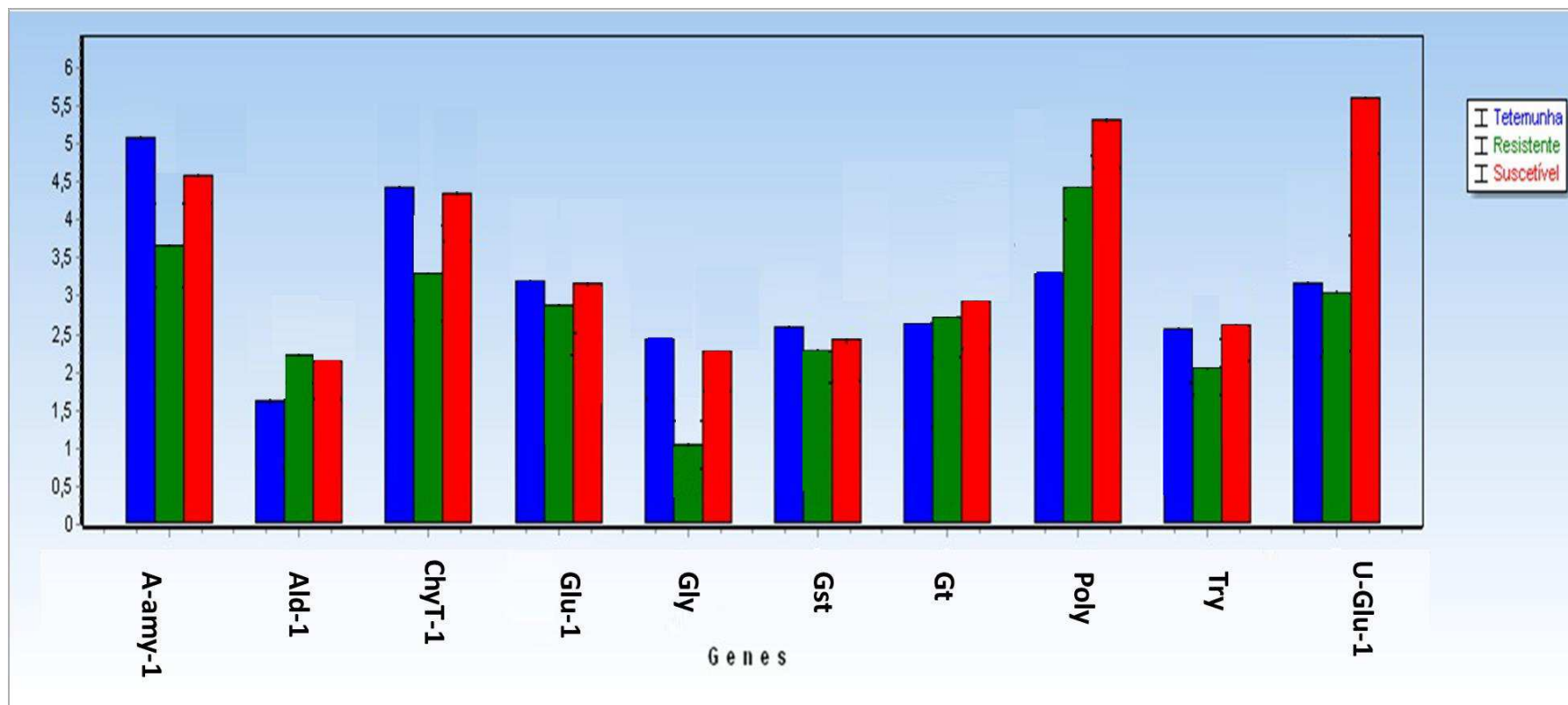
Os Genes Gly e Poly foram reprimidos no inseto quando alimentado com material resistente, que foi o mesmo caso dos últimos três descritos anteriormente sendo que o Gly está envolto na via metabólica da enzima *Glycogen phosphorylase*. O Poly quando o inseto estava em jejum apresentou mais inibição do gene do que quando o inseto se alimentou

com material resistente. A enzima *Polygalacturonase*, que é o gene Poly, está envolvida nas vias metabólicas que auxiliam na degradação da pectina, um polissacarídeo complexo, que na maioria das vezes é encontrado na lamela média e na parede celular primária dos vegetais, que são ligados ao processo de infecção do tecido vegetal, sendo muitas vezes considerados como virulência de diversos organismos (COOPER et al., 1998; GIOVANNONI et al., 1989; RODRIGUEZ-PALENZUELA; BURR; COLLMER, 1991; RIBEIRO, 2001).

O gene a-amy, que é a enzima *alpha-amylase*, teve uma maior taxa de expressão quando os insetos estavam submetidos ao jejum e reprimido quando alimentado com material resistente. Essa enzima está envolvida na digestão, sendo capazes de hidrolisar o amido, glicogênio, amilopectina e amilase respondendo com a liberação de dissacarídeos e trissacarídeos (MOHAMED, 2000). Para o gene Try não houve diferença, porém ele foi reprimido quando o inseto se alimentou de material resistente, ou seja, foi inibido. A tripsina que é a enzima do gene Try, normalmente está envolvida na via metabólica de conceder resistência as plantas quando atacadas por insetos herbívoros (BENSON et al., 2003)

Alguns genes como o (ChyT-1 e) tiveram taxa elevada de expressão gênica tanto com o inseto em jejum quanto alimentando-se com material suscetível, sendo reprimido quando o inseto se alimentou com material resistente. Esse gene *Chymotrypsin* também está ligado a tripsina.

Figura 25 - Comparação relativa da expressão gênica dos genes de interesse (a-amy, Ald-1, ChyT-1, Glu-1, Gly, Gst, Gt, Poly, Try, U-Glu-1) em três grupos: insetos jejum de 2 horas, insetos alimentando com clone híbrido de Eucalyptus resistente, insetos alimentando com clone híbrido de Eucalyptus suscetível. No eixo Y está representada a média da expressão gênica relativa na escala log2. O erro padrão da média é indicado para um intervalo de confiança de 95%. Os dados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas tendo, cada uma, 2 réplicas técnicas.



Fonte. Autor, 2020.

Ao analisar a expressão gênica em intestino de *Bemisia tabaci*, YE et al., (2014) verificaram que muitos genes específicos do intestino estavam diretamente envolvidos na resistência a inseticidas e que outros participavam do metabolismo de detoxificação, possivelmente os responsáveis por essa praga ser resistente a muitas drogas e aos estresses ambientais.

#### 4 CONCLUSÕES

- Os genes RprolR76b e G6pdh, são os mais específicos para validação dos resultados, sendo indicados como os melhores genes endógenos.
- Os genes U-glu-1, Try, Poly, Gly, ChyT-1 foram reprimidos no inseto quando este se alimentou de clone de eucalipto resistente.
- Os Genes Try, a-amy, ChyT-1, Glu-1, Gly, Gst tiveram uma taxa considerável de expressão gênica quando os insetos permaneceram sob jejum, enquanto os genes Poly, U-Glu-1, Ald-1 foram reprimidos.
- Os genes estudados podem ser considerados como sendo um indicativo da ocorrência de estresse no inseto em defesa às substâncias liberadas pelas plantas

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos moleculares envolvendo a interação inseto/planta vêm sendo um dos melhores métodos para obtenção de plantas melhoradas, além de ser um método sustentável que não danifica o meio ambiente e que tem ganhado grande espaço nas pesquisas. O estudo da expressão gênica auxilia o melhoramento de plantas, tornando-as mais resistentes ao ataque de insetos, não sendo necessária a utilização de produtos químicos no controle do inseto praga, contribuindo para a diminuição do uso de agrotóxicos no setor florestal.

O presente estudo auxilia em futuras pesquisas de melhoramento do eucalipto na busca de genótipos resistente ao ataque do *T. peregrinus*, visto ser a melhor estratégia de controle da praga, uma vez que o controle químico é barrado pela certificação florestal e o controle biológico não tem eficiência aceitável pelo mercado. Sendo assim estudos de resistência da planta ao ataque da praga são de grande valia para o setor florestal.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENSON, D. A.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; BOBROWSKI, V. L. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.843-850, 2003.
- BOLTER, C.; JONGSMA, M. A: The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J Insect Physiol**, v. 43, n. 10, p. 885–895, out. 1997.
- BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. **J Insect Physiol**, v. 32, n.10, p. 827-833, 1986.
- COOPER, W.; BOUZAYEN, M.; HAMILTON, A.; BARRY, C.; ROSSALL, S. GRIERSON, D. Use of transgenic plants to study the role of ethylene and polygalacturonase during infection of tomato fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 308-316, 1998.
- DESPRES, L.; DAVID, J. P.; GALLET, C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 6, p. 298-307, 2007.
- DESROCHE, N.; BELTRAMO, C.; GUZZO, J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lac-tic acid bacterium *Oenococcus oeni*. **J. Microbiological Methods**, v. 60, p. 325-333, 2005.
- ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect. Mol. Biol.**, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.
- EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 131, p. 1-12, 2008.
- FERNANDES, L. R. L. Expressão diferencial de genes relacionados à resposta imune do mosquito *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*. 2014. 55 f. Dissertação (Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Inpa, Manaus, 2014.
- FYRBERG, E. A.; KINDLE, K. L.; DAVIDSON, N. The actin genes of *Drosophila*: A dispersed multigene family. **Cell**, v. 19, p. 365-378, 1980.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n.6, p. 503–512, 2002.
- GIOVANNONI, J. J; DELLAPENNA, D.; LASHBROOK, C .C; BENNETT, A. B.; FISCHER, R. L. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening). **The plant cel.**, v. 1, p. 53-63, 1989.
- GUÉNIN, S.T; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; WUYTSWINKEL, O. V.; BELLINI, C.; GUTIERRE, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic,



experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 487-493, 2009.

GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUÉNIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.-F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. L. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609-618, 2008.

HADDEN, T. J.; SODJA, A. An oligogene family encodes actins in the housefly, *Musca domestica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 1, p. 523–531, 1994.

HARA, M. R.; AGRAWAL, N.; KIM, S. F.; CASCIO, M. B.; FUJIMURO, M.; OZEKI, Y.; TAKAHASHI, M.; CHEAH, J. H.; TANKOU, S. K.; HESTER, L. D.; FERRIS, C. D.; AYWARD, S. D.; SNYDER, S. H.; SAWA, A. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nature Cell Biology**, v. 7, p. 665-674, 2005.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006.

JONES, R. T.; BAKKER, S. E.; STONE, D.; SHUTTLEWORTH, S. N.; BOUNDY, S.; MCCART, C.; DABORN, P. J.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; VAN DEN ELSEN, J. M. Homology modelling of *Drosophila* cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. **Pest Manag Sci**, v. 66, n. 10, p. 1106–1115, 2010.

MACÁRIO, M. dos S. Genes de referência para expressão gênica em codornas de corte. 2016. 51 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia), Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

MOHAMED, S. A. Alpha-Amylase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 126, p. 99-108, 2000.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos**. Embrapa Semiárido, 2016. 63p.

MOUNIER, N.; GOUY, M.; MOUCHIRAND, D.; PRUDHOME, J. C. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, p. 406–415, 1987.

PAIM, R. M.; PEREIRA, M. H.; DI PONZIO, R.; RODRIGUES, J. O.; GUARNERI, A. A.; GONTIJO, N. F.; ARAUJO, R. N. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. **BMC Res Notes**, v. 5, n. 128, p. 2-11, 2012.

PARDE, V. D.; SHARMA, H C.; KACHOLE, M. S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. **J Insect Physiol**, v. 56, n. 9, p. 1315–1324, 2010.

PUINEAN, A. M.; FOSTER, S. P.; OLIPHANT, L.; DENHOLM, I.; FIELD, L. M.; MILLAR, N. S.; WILLIAMSON, M. S.; BASS, C. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. **PLOS Genetics**, v. 6, n.6, p. 1-11, 2010.

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 179–181, 2002.

RIBEIRO, J. B. **Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonases e transformação de *Penicillium expansum***. 2001. 70 f. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-mg, 2001.

RODRIGUES, A. C. P. **Identificação de genes diferencialmente expressos em híbridos de eucalyptus sp. Afetados por anomalias morfológicas e fisiológicas de causa desconhecida**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestre em Ciência Florestal), Engenharia Florestal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. BURR, T. J, COLLMER A. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. **J. Bacteriol**, v. 173, n. 20, p. 6547-6552, 1991.

SALAZAR, C. E.; HAMM, D. M.; WESSON, D. M.; BEARD, C. B.; KUMAR, K.; COLLINS, F. H. A cytoskeletal actin gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 1, n.3, p. 1 – 13, 1994.

SOUZA, K. C. N. **Validação do nível de expressão gênica diferencial dos genes actina, tripsina e phosrrestin ii entre larvas e adultos de anopheles darlingi root, 1926 (diptera: culicidae)**. 2011. 52 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.

TRISTAN, C.; SHAHANI, N.; SEDLAK, T.W.; SAWA, A. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Elsevier - Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, 2011.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, Natick, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

YAN, L.; YANG, P.; JIANG, F.; CUI, N.; MA, E.; QIAO, C.; CUI, F. Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. **BMC Genomics**, v. 13, n. 609, p. 1-18, 2012.

YE, X. D.; SU, Y. L.; ZHAO, Q. Y.; XIA, W. Q.; LIU, S. S.; WANG, X. W. Transcriptomic analyses reveal the adaptive features and biological differences of guts from two invasive whitefly species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 370, p. 2-12, 2014.

ZAFAR, R. S.; SODJA, A. Homology in the actin coding and adjacent sequences in two widely divergent species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 111, n.1, p. 67–73, 1983.

ZHENG, R.; YE, Z. H. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. **Plant Sci**, v. 229, p. 193-207, 2014.